

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Steffen Massberg

DIE ROLLE DER SERUMBESTANDTEILE UND ZYTOSKELETTELEMENTE IN DER THROMBOZYTENMIGRATION

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gökçe Yavuz
aus Istanbul
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Bernhard Heindl
Prof. Dr. med. Matthias Jacob
PD. Dr. med. Gregor Kemming

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Florian Gärtner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2020

Für meine Mutter Neşe Yavuz

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die der Fakultät für Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgelegte Dissertation mit dem Titel:

*Die Rolle der Serumbestandteile und Zytoskelettelemente in der
Thrombozytenmigration*

unter der Anleitung und Betreuung durch Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg eigenständig angefertigt habe, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

München, den 18.06.2019

Gökçe Yavuz

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die Möglichkeit, in seinem Labor zu arbeiten und für die kompetente wissenschaftliche Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Florian Gärtner für die hervorragende Betreuung, seinen Hilfestellungen und Ratschlägen sowie seine fachliche und menschliche Unterstützung. Ganz herzlichen Dank gilt an meiner Arbeitsgruppe für ihre Hilfsbereitschaft und angenehme Atmosphäre. Bei Zerkah Ahmad, Marina Hoffmann und Michael Lorenz möchte ich mich für die Einweisung der hier angewandten Methodik bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank an meinen Freunden Fabian Bross, Johannes Kleybolte, İsmail Kuru und Aslı Okur Kuru für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Bei meinen Eltern, Neşe und Mustafa Yavuz, meinem Bruder, Mert Yavuz, und meiner langjährigen Mitbewohnerin, Ilgın Eke, möchte ich mich besonders von ganzem Herzen für ihre liebevolle und vielseitige Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	iv
Tabellenverzeichnis	vi
Abkürzungsverzeichnis.....	vii
1 Einleitung	1
1.1 Die Thrombusformation – ein dynamischer Prozess	1
1.2 Die Integrin-Ligand-Komplexe	3
1.3 Die Zytoskelettelemente.....	5
1.4 Der Serumfaktor	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Thrombozytenisolation.....	17
2.1.1 Präparation des ACD Vollblutes.....	17
2.1.2 Erstellung des Tyrodes-Puffers.....	17
2.1.3 Präparation des plättchenreichen Plasmas (PRP) und der gewaschenen Plättchen (WP).....	18
2.2 In-vitro-Analyse der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenmigration	19
2.2.1 Glas als Oberfläche	20
2.2.2 Etablierung der HMDS-Beschichtung	21
2.2.3 Präparation des Serums.....	24
2.2.4 Das Kontrollversuchsprotokoll	26
2.3 In-vitro-Analyse der Rolle von Integrin-Ligand-Komplexen auf die Thrombozytenmigration	26
2.4 Der Serumfaktor und dessen Wirkung auf die Thrombozytenmigration	28
2.4.1 Die Serumdialyse.....	28
2.4.2 Die Serumproteine	28
2.5 In-vitro-Analyse der Rolle von Zytoskelettelemente auf die Thrombozytenmigration	31
2.6 Das Differential-Interferenz-Kontrast-(DIC)-Mikroskop	32

2.6.1	Aufbau und Prinzip des DIC Mikroskops.....	32
2.6.2	Mikroskop Set-Up.....	33
2.6.3	Software	33
2.7	Quantifizierung der Daten	34
2.7.1	ImageJ – Einstellung des Programms	34
2.7.2	ImageJ – Tracken der Thrombozyten	35
2.7.3	Auswertung der Ergebnisse – Excel	35
2.7.4	Statistische Überprüfung der Ergebnisse – SPSS	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Blockierung der GPIIb/IIIa-Fibrinogen-Verbindung inhibiert die Thrombozytenmigration	38
3.1.1	RGD-Peptide inhibieren die Thrombozytenadhäsion und -migration	38
3.1.2	GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist inhibiert die Thrombozytenmigration.....	40
3.2	Inhibierung von Myosin verhindert die Migration und verursacht morphologische Veränderungen.....	41
3.2.1	Der direkte Myosin II-Inhibitor vermindert die Migrationsrate und -geschwindigkeit.....	42
3.2.2	Die Myosininhibierung über Rho-Rock-Kaskade verursacht morphologische Veränderungen.....	44
3.3	Cytochalasin D, Inhibitor der Aktinpolymerisation, verhindert die Migration.....	47
3.4	Calyculin A beeinflusst die Reorganisation der Zytoskelettelemente und verändert die Morphologie der Thrombozyten.....	50
3.5	Calcium als zentrales Ion in der Thrombozytenmigration	54
3.5.1	Serumdialyseverfahren mit Filtrierung von Calciumionen.....	54
3.5.2	Calciumkonzentrationsreihe zur Bestimmung der optimalen Calciumkonzentration für die Thrombozytenmigration	56
3.6	Die Wirkung von anderen Ionen auf die Thrombozytenmigration	57
3.7	Albumin als essenzielles Protein für die Thrombozytenmigration	61
3.8	Die Wirkung von anderen Proteinen auf die Thrombozytenmigration.....	65
4	Diskussion	70
4.1	Die Rolle des GPIIb/IIIa-Komplexes in der Thrombozytenmigration.....	70
4.2	Die Rolle der Zytoskelettelemente in der Thrombozytenmigration.....	72

4.3 Die Rolle von Serumbestandteilen in der Thrombozytenmigration.....	76
5 Zusammenfassung.....	80
Literaturverzeichnis	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Thrombusformation	3
Abbildung 2: Integrin-Ligand-Komplex GPIIb/IIIa und Signalwege	5
Abbildung 3: Fluoreszenz Bilder von Keratozyten bei unterschiedlichen Adhäsionsstärken ...	7
Abbildung 4: Durchlicht mikroskopische (DIC) Bilder von Thrombozyten während der Migration	8
Abbildung 5: Rho-Rock-Kaskade und Regulation der Myosinaktivität.....	10
Abbildung 6: Thrombozytenisolation	19
Abbildung 7: Standardkontrollversuch	19
Abbildung 8: Wirkung der Vorbehandlung von Slides auf die Thrombozytenmigration.	23
Abbildung 9: Die Phasen von Spin coating/ Beschichtung.	24
Abbildung 10: Bearbeitungsprinzip des DIC Mikroskops.....	32
Abbildung 11: Darstellung des Einflusses von RGD-Peptiden auf die Thrombozytenmigration.	40
Abbildung 12: Thrombozytenmigration nach Blockierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors.....	41
Abbildung 13: Blebbistatinwirkung auf die Thrombozytenmigration.....	44
Abbildung 14: Formveränderungen der Thrombozyten unter Blebbistatinwirkung.	44
Abbildung 15: Wirkung der Inhibition von Myosin über die Rho-Rock-Kaskade auf das Migrationsverhalten der Thrombozyten.	46
Abbildung 16: Zytoplasmatische Formveränderungen der Thrombozyten unter Myosininaktivierung mittels Rock-Inhibitoren.	47
Abbildung 17: Wirkung von Inhibition der Aktinpolymerisation auf Thrombozytenadhäsion und -migration.	49
Abbildung 18: Morphologische Veränderungen der Thrombozyten unter Aktininhibition mittels Cytochalasin D.....	50
Abbildung 19: Wirkung von Calyculin A auf die Thrombozytenmigration.....	52
Abbildung 20: Morphologische Veränderungen unter Wirkung von Calyculin A.....	53
Abbildung 21: Wirkung der Filtration von Calciumionen aus dem Serum auf die Thrombozytenmigration.	56
Abbildung 22: Calciumkonzentrationsreihe und Thrombozytenmigration.	57
Abbildung 23: Wirkung von Magnesium auf die Thrombozytenmigration.	59

Abbildung 24: Vergleich der Wirkungen von Calcium und anderer Ionen auf die Thrombozytenmigration.	61
Abbildung 25: Adhäsion und Migration unter Verwendung von Albumin, Calcium oder Serum.	62
Abbildung 26: Albuminkonzentrationsreihe und Thrombozytenmigration.	64
Abbildung 27: Vergleich von Albumin mit humanem Komplement-Serum.....	65
Abbildung 28: Vergleich der Wirkung von Albumin und Ovalbumin auf die Thrombozytenmigration.	66
Abbildung 29: Wirkung von verdauten Proteinen auf die Thrombozytenmigration.	67
Abbildung 30: Wirkung der Verdauung von Albumin auf die Thrombozytenmigration.	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Substanzen für Serum- und Thrombozytenpräparation	25
Tabelle 2: Substanzen für die Aktivierung der Thrombozyten	26
Tabelle 3: Substanzen für die Inhibierung des GPIIb/IIIa-Komplexes	27
Tabelle 4: Proteine und Ionen	30
Tabelle 5: Substanzen zur Inhibierung der Zytoskelettelemente	31
Tabelle 6: Auswahl der Videogrößen	34

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acid-Citrate-Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
amp	alle migrierende Plättchen
ap	adhärente Plättchen
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CIB1	Calcium und Integrin-bindendes-Protein-1
CCD	Charge-coupled Device
COX1	Cyclooxygenase 1
DIC	Differential-Interferenz-Kontrast
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
emp	einzel migrierende Plättchen
F-Aktin	Aktinfilamente
Fbg	Fibrinogen
G-Aktin	Aktinmonomere
GP	Glykoprotein
GPCR	G-Protein-Coupled Receptor
HMDS	Hexamethyldisilazin
H ₂ O	Wasser
HNO ₃	Salpetersäure
KCL	Kaliumchlorid
Mg	Magnesium
MHY-9-Gen	Myosin Heavy Chain 9 Gen
MLC	Myosinleichtketten
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MLCP	Myosinleichtkettenphosphatase
mPP	Myosinphosphatase
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
nmp	nicht migrierende Plättchen
PAR	Protease Activated Receptor
PBS	Phosphatase-buffered-saline

PMN	Polymorphonuclearen Leukozyten
PPACK	D-Phenylalanin-L-Prolin-L-Arginin-Chloromethylketon
PRP	Plättchenreiches Plasma
RGDS	Arg-Gly-Asp-Sequenz
RGES	Arg-Gly-Glu-Sequenz
ROCK	RhoA-Kinase-1
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
TXA2	Thromboxan A2
VWF	von Willebrandfaktor
WP	gewaschene Plättchen

1 Einleitung

1.1 Die Thrombusformation – ein dynamischer Prozess

Thrombozyten sind kernlose, kleine Blutzellen mit einem Durchmesser von 1,5µm bis 3,0µm, die im Knochenmark entstehen, wo sie von den Megakaryozyten abgeschnürt werden (Italiano et al., 2007, Junt et al., 2007). Dieser Vorgang wird als Thrombopoese bezeichnet und von dem Hormon Thrombopoietin stimuliert (Stenberg and Levin, 1989). Die im Knochenmark entstandenen Thrombozyten werden in das Blut abgegeben und halten sich im zirkulierenden Blut 8-12 Tage lang auf. Danach werden sie hauptsächlich in der Milz und in geringerem Maße auch in der Leber abgebaut.

Die Thrombozyten spielen die Hauptrolle in der Blutstillung. Die primäre Hämostase mit der Thrombusbildung verhindert den Blutverlust durch das Verschließen des Defektes des Gefäßendothels. Die Thrombusformation tritt aber auch pathologisch auf, so bei Inflammation oder bei Arteriosklerose, die dann unkontrolliert ablaufen und zu einer Gefäßokklusion führen können. Infolge der Gefäßokklusion nimmt der Blutfluss ab und es kann zu einer Minderversorgung und dem folgend zur Ischämie von Organen kommen. Besonders gefährdet sind die lebenswichtigen Organe wie Herz und Gehirn (Massberg et al., 2005). Deshalb ist das Verständnis des genauen Ablaufes von Thrombusformation mit allen beteiligten Mediatoren und Rezeptoren äußerst wichtig, nicht zuletzt für die therapeutische Kontrolle der Blutgerinnung und Thrombusbildung sowie die Prävention von Gefäßverschlüssen, die als Folge pathologischer Thromben entstehen. In diesem Kapitel soll die primäre Hämostase mit der Thrombusformation im Detail beschrieben werden.

In der Regel befinden sich die Thrombozyten in einer inaktivierten Form und zirkulieren in den Blutgefäßen in Richtung des Blutflusses. Wenn es zu einer Gefäßläsion kommt, werden sie von mehreren Mediatoren aktiviert. Die aktivierten Thrombozyten interagieren mit der extrazellulären Matrix, welche adhäsive Moleküle wie Laminin, Fibronectin, Kollagen und von Willebrand-Faktor (vWF) beinhaltet. Die erste Anbindung der Thrombozyten an die extrazelluläre Matrix (tethering) erfolgt durch die Interaktion zwischen dem Thrombozytenrezeptor GPIb-IX-V und vWF (Ruggeri, 1997, Clemetson and Clemetson, 2007). Diese Bindung ist nicht stark genug um eine stabile Adhäsion zu erzeugen, hält aber die Thrombozyten in der

Nähe der Gefäßwand. Die Thrombozyten rollen in Richtung des Blutflusses an der Gefäßwand (rolling) (Savage et al., 1996). Während des Rollens binden Thrombozyten an das extrazelluläre Matrix Protein, Kollagen, mittels ihres Membranrezeptors GPVI und heften an der geschädigten Gefäßwand an (Massberg et al., 2003). Dieser Prozess wird Thrombozytenadhäsion genannt. Die aktivierten Thrombozyten fangen an, ihre Form zu ändern. Durch die Umlagerung des Zytoskeletts und die Bildung von Pseudopodien (Füßchen) vergrößern sie ihre Oberfläche. Schließlich setzen sie gerinnungsfördernde Stoffe wie Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan A2 (TXA2) frei. ADP ist in den sogenannten ‚dense‘ Granula gespeichert und wird nach einer Thrombozytenaktivierung freigesetzt (Gachet, 2008). Es bindet an den thrombozytären ADP-Rezeptoren (P2Y1, P2Y12) und aktiviert durch intrazelluläre Signaltransduktion den GPIIb/IIIa-Integrin-Komplex. Der aktivierte GPIIb/IIIa-Rezeptor führt zu einer Bindung von adhäsiven Proteinen, vor allem von Fibrinogen und vWF an der Thrombozytenoberfläche (Shattil and Newman, 2004). TXA2 ist ein Lipid, das mittels Cyclooxygenase 1 (COX1) aus Arachidonsäure gebildet wird (Samuelsson et al., 1978). Sowohl ADP als auch TXA2 binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und verstärken die aggregationsfördernden Signale (Offermanns, 2006). Diese Verstärkung führt zu einer Konformationsänderung des Fibrinogen-Rezeptors GPIIb/IIIa, sodass das Fibrinogen mit hoher Affinität bindet (Inside-out-signaling) (Li et al., 2010, Shattil and Newman, 2004). Das Fibrinogen dient als Substrat für die Anheftung weiterer Thrombozyten mittels GPIIb/IIIa-Rezeptoren und ermöglicht die Quervernetzung mit anderen Thrombozyten. Außerdem erhöht die verstärkte Verbindung von Fibrinogen an dem Rezeptor die Aktivität im Zellinneren (Outside-in-signaling) (Li et al., 2010). Zusätzlich zu den von den Thrombozyten sezernierten Mediatoren wird lokal am geschädigten Gefäßendothel Thrombin gebildet. Neben der Aktivierung der Thrombozyten über die Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 4 (PAR1 und PAR4) führt das Thrombin zur Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, was zur Bildung eines FaserNetzwerkes und dadurch zur Stabilisierung des Blutgerinnsels dient (Ono et al., 2008, Chou et al., 2004). Als Ergebnis dieser Prozesskaskade heften die aktivierten Thrombozyten an der Gefäßwand und zusätzlich aneinander an und bilden einen Thrombus. Dieser Vorgang wird als Thrombozytenaggregation bezeichnet (Varga-Szabo et al., 2008). Mittels der Verbindung zwischen GPIIb/IIIa und Fibrinogen und in der Anwesenheit des Serums beginnen die Thrombozyten zu migrieren. Die Abbildung 1 (Gärtner, 2012) stellt die oben beschriebenen Prozesse graphisch dar.

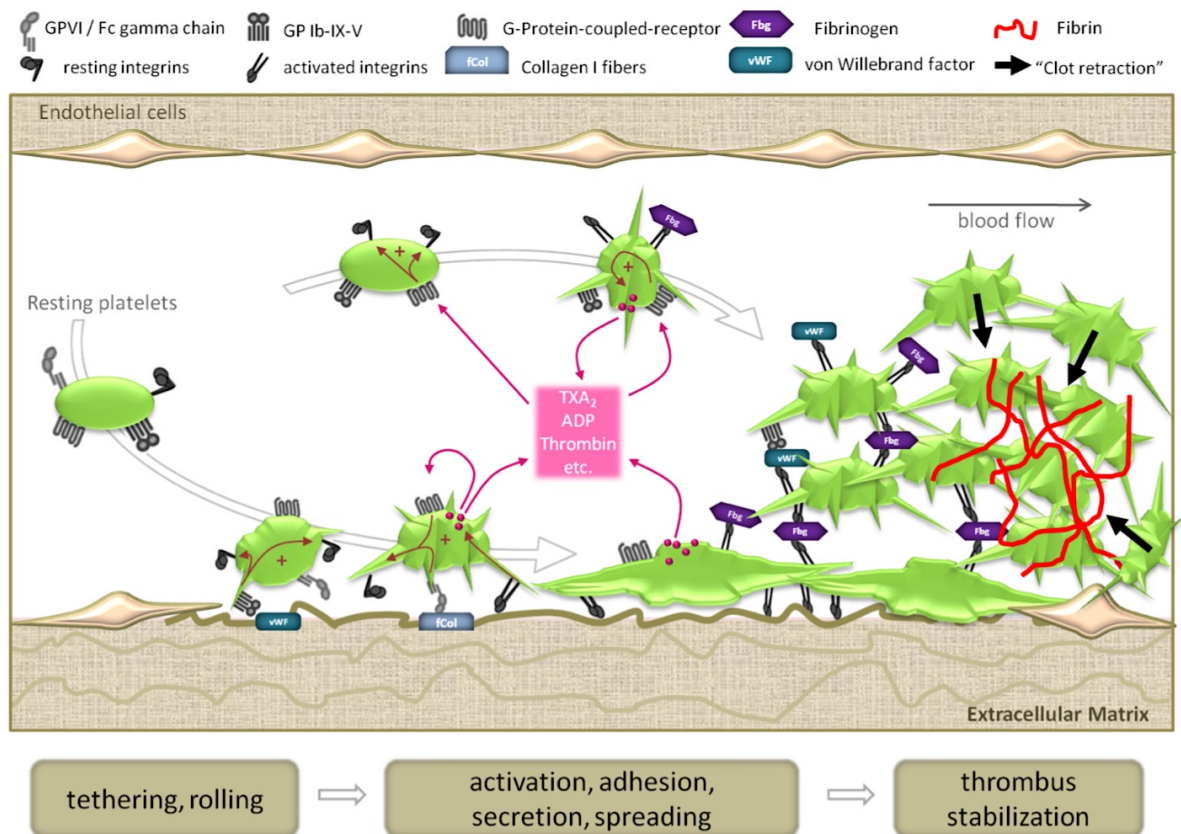


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Thrombusformation
(Gärtner, 2012)

Die Thrombozytenmigration ist ein aktiver, dynamischer Prozess, der von unterschiedlichen Einflüssen abhängig ist. Diese kann man in drei Gruppen unterteilen: die Rezeptor-Ligand-Komplexe, die Elemente im Serum und die Zytoskelettelemente. Im weiteren Kapitel werden diese drei Gruppen und deren Wirkung auf die Thrombozyten separat erklärt.

1.2 Die Integrin-Ligand-Komplexe

Die Thrombozyten haben an ihrer Oberflächen unterschiedliche Integrine, die als Rezeptoren mit verschiedenen Matrixproteinen wie Vitronectin, Laminin, Fibronectin, Kollagen und Fibrinogen interagieren können. Die Integrine sind für die Migration essenziell, weil sie mittels der Verbindung mit der extrazellulären Matrix die Kraft und die Signale für die Lokomotion übertragen (Hynes, 1992, Lauffenburger and Horwitz, 1996). Die Geschwindigkeit der Migration und ob es zu einer Migration kommt, wird von den Integrin-Ligand-Interaktionen beeinflusst, die von dem Ligandendichte, der Integrin-Expression der Zelle und der Integrin-Ligand-

Bindungsaffinität abhängig sind (Bauer et al., 1992, DiMilla et al., 1993, Huttenlocher et al., 1996). Die maximale Migrationsgeschwindigkeit kann bei einem intermediären Verhältnis von der Zell-Substrat-Bindekraft zu der intrazellulären Kontraktionskraft erreicht werden, weil dieses Verhältnis die Bildung von neuen Verbindungen am vorderen Ende der Zelle und gleichzeitig den Abbruch der Bindungen am hinteren Ende der Zelle ermöglicht (DiMilla et al., 1991). Bei niedrigerer Ligand-Konzentration sind die Zellen runder und sie bilden Lamellipodien, die im Vergleich zu den migrierenden Zellen kleiner und instabiler sind. Bei höherer Ligand-Konzentration bilden die Zellen ebenso Lamellipodien, können sich aber wegen der zu hohen Adhäsionsrate nicht bewegen (Palecek et al., 1997).

Einer der wichtigsten Integrin-Ligand-Komplexe ist GPIIb/IIIa, ein Fibrinogen-Rezeptor Glykoprotein (Massberg et al., 2005). GPIIb/IIIa ist ein Calcium-abhängiger Komplex, der nach der Aktivierung vom Thrombozyten als Rezeptor der Bindung an Adhäsionsproteine wie Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin und vWF dient (Parise and Phillips, 1985). Die Verbindung zwischen Fibrinogen und dem GPIIb/IIIa-Komplex führt zur Thrombozytenaggregation (Marguerie et al., 1979). Der dadurch entstandene Thrombus besteht aus den Thrombozyten und weiteren Blutzellen, die mittels Fibrin, Fibronectin und Plasminogen zu einer Matrix vernetzt werden. GPIIb/IIIa kann sowohl von den Agonisten wie Thrombin und ADP als auch von den GPIb-IX-V und GPVI aktiviert werden (Kasirer-Friede et al., 2004).

Fibrinogen ist ein aus je zwei α -, β - und γ -Untereinheiten bestehender hexamerer Proteinkomplex. Er besitzt zwei Stellen, die für die Verbindung mit dem GPIIb/IIIa-Komplex geeignet sind: ein Peptid an der C(carboxyl)-terminalen Seite der γ -Kette und zwei RGD (Arg-Gly-Asp)-Sequenzen in der α -Kette (Lam et al., 1987). Die beiden Bindungsstellen an der γ -Kette und α -Kette arbeiten synergistisch und dies ist erforderlich für die optimale Funktion des Fibrinogen-GPIIb/IIIa-Komplexes. Die Bindung der RGD-Sequenz oder γ -Kette an den GPIIb/IIIa-Komplex induziert eine Konformationsänderung des Komplexes, die dessen Affinität an einer zweiten Bindung mit Fibrinogen erhöht (Mohri and Ohkubo, 1993). Die RGD-Peptide blockieren die Verbindung zwischen Fibrinogen und den Thrombozyten sowohl mittels der Bindung an RGD-Sequenzen des Fibrinogens als auch mittels einer direkten Bindung an Thrombozyten (Ruggeri et al., 1986, Pytela et al., 1986). Wegen seiner Hauptrolle in der Thrombozytenaggregation wurden für die Inhibierung des GPIIb/IIIa-Komplexes verschiedene Stoffe wie der Antikörper Abciximab, ein GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist, und RGD-Peptide-Analoga entwickelt (Quinn et al., 2003).

Das durch Agonisten ADP-vermittelte Inside-out-signaling aktiviert Integrine und ermöglicht die Bindung von Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ an dessen Ligand Fibrinogen (O'Toole et al., 1994). Die Zytoskelettelemente wie Aktin, die durch das Inside-out-signaling aktiviert werden, spielen auch eine Rolle bei der Regulation der Integrin-Funktion. Bei einer Aktivierung von Thrombozyten mittels ADP kommt es zu einer Reorganisation der Aktinfilamente. Aktin assoziierten Proteine wie Talin binden an aktiviertes Integrin und erhöhen die Integrin-Aktin-Interaktion (Knezevic et al., 1996). Diese Interaktion führt zu einer Konformationsänderung des $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Integrins, welche wiederum die Affinität des $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Integrins zum Fibrinogen erhöht (Bennett et al., 1999). Die Inhibierung der Aktin-Polymerisation mittels Cytochalasin D, das an die offenen Enden von Aktinfilamenten bindet und dadurch die Aktivierung des Aktinzytoskeletts verhindert, hält die Affinität des $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Integrins an die Bindung mit Fibrinogen niedrig (siehe Abbildung 2) (Peerschke, 1984).

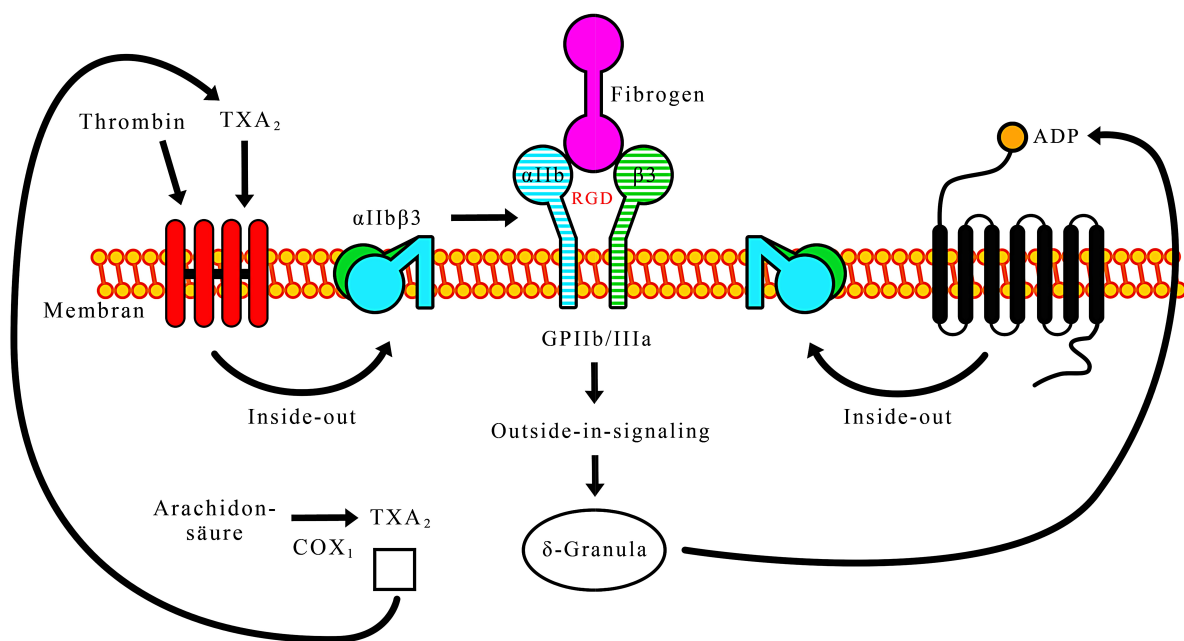


Abbildung 2: Integrin-Ligand-Komplex GPIIb/IIIa und Signalwege

1.3 Die Zytoskelettelemente

Das Zytoskelett ist ein komplexes, bewegliches Gerüst, das aus verschiedenen dünnen, fadenförmigen Proteinen (Filamenten) zusammengesetzt ist. Diese Proteine – Aktinfilamente (Mikrofilamente), Intermediärfilamente und Mikrotubuli – reichen vom Zellkern bis zur Zellmembran. Sie sind für die mechanische Stabilisierung sowie für die aktive Bewegung der

Zelle zuständig. Weiterhin ermöglichen sie Transporte innerhalb der Zelle. Bei der Thrombusformation durch die Thrombozyten spielen auch die Zytoskelettelemente eine Rolle.

Die Thrombusformation wird in zwei Phasen unterteilt: die primäre Hämostase mit der Bildung eines Thrombozytenaggregats, das ausschließlich aus Thrombozyten zusammengesetzt wird, und die sekundäre Hämostase, die durch Stabilisierung des Thrombozytenaggregats mittels Fibrinpolymeren charakterisiert ist (Crawley et al., 2007). Während der Bildung des Thrombozytenaggregats ändern sich die Morphologie und die Funktion der Thrombozyten, durch Remodellierung des Aktinzytoskeletts. Diese Veränderungen im Zytoskelett sind unerlässlich für die Thrombozytenfunktion und für die normale primäre Hämostase und werden von verschiedenen Proteinen durch komplexe Signalkaskaden reguliert.

Das Aktin-basierte Zytoskelett kann in zwei funktionelle Einheiten unterteilt werden: das an Spektrin reiche Membranskelett, das die innere Plasmamembran überzieht und das Zytoskelett bestehend aus langen Aktinfilamenten, die von der Zellmitte in die Peripherie bis zur Zellmembran strahlen (Hartwig and DeSisto, 1991). Das Membranskelett ist zuständig für die Erhaltung der Struktur und Integrität der Plasmamembran, während das Aktinzytoskelett durch seine Verbindungen mit Myosin in der Zelle Kontraktionskräfte entwickelt (Pollard, 1981). Diese Kontraktionskräfte regulieren die Veränderungen der Thrombozytenform (Daniel et al., 1984) und fördern die Sekretion von Granulainhalten (Flaumenhaft, 2003). Durch eine Übertragung der Kontraktionskräfte in die Zellmembran wird die Retraktion des Fibringerinnsels unterstützt (Cohen, 1979).

Die genaue Verteilung der Zytoskelettelemente in der Zelle wurde bei unterschiedlichen Zelltypen untersucht. Das Modell bei den Keratozyten beschreibt die Formänderung der Keratozyten während der Adhäsion und Migration unter Berücksichtigung der Organisation von Zytoskelettelemente und der Adhäsionsstärke (Barnhart et al., 2011). Nach diesem Modell werden die Zellen während der Adhäsion flach. Sie vergrößern ihre Oberfläche mittels der Bildung von Pseudopodien. Die Zytoskelettelemente – Aktin und Myosin – verteilen sich während dieser Formänderung nach einer bestimmten Anordnung. In der Vorderseite der Keratozyten befinden sich die Aktinfasern mit einer hohen Dichte, welche den Membranwiderstand pro Faser erniedrigt. Das ermöglicht die Polymerisation der Aktinfasern und dadurch die Migration der Keratozyten in eine Richtung. In der Zellmitte (Zellkörper) bilden die Aktin- und Myosinfasern ein Netz, welches zu einer Retraktion des Zellkörpers führt und damit die Keratozyten während der Migration als komplette Zelle zusammenhält. Bei diesem Prozess entstehen zwei Kanten im Kerotozytkörper, die als Vorderkante (leading edge) und als Hin-

terkante (trailing edge) bezeichnet werden. Die Protrusion findet in der Vorderkante und die Retraktion in der Hinterkante der Zelle statt. An der Vorderkante der Zelle entsteht durch die Polymerisation der Aktinfasern eine Verlängerung des Zytoplasmas in die Migrationsrichtung. Diese speziellen länglichen Formen des Zytoplasmas werden Lamellipodia und Filopodia genannt. Die Bilder der Keratozyten, die mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen sind, zeigen die Verteilung der Aktin und Myosinfilamente: Die Aktinfilamente sind in der Vorderkante und die Myosinfilamente in der Hinterkante lokalisiert (siehe Abbildung 3). Im Vergleich dazu werden Durchlicht mikroskopische (DIC) Bilder von Thrombozyten während der Adhäsion und Migration aufgenommen, welche die Ähnlichkeit der Form und der Verteilung zeigen (siehe Abbildung 4). Zusätzlich werden die Organisation der Aktinfasern und die Geschwindigkeit der Zellmigration von der Adhäsionsstärke und Myosinkontraktion beeinflusst (Gupton and Waterman-Storer, 2006). Die Keratozyten mit einer intermediären Adhäsionsstärke haben die höchste Migrationsgeschwindigkeit und eine flache Form (fan-shaped) wobei die Keratozyten mit einer hohen oder niedrigen Adhäsionsstärke eher eine runde Form haben und langsamer migrieren (siehe Abbildung 3) (Barnhart et al., 2011).

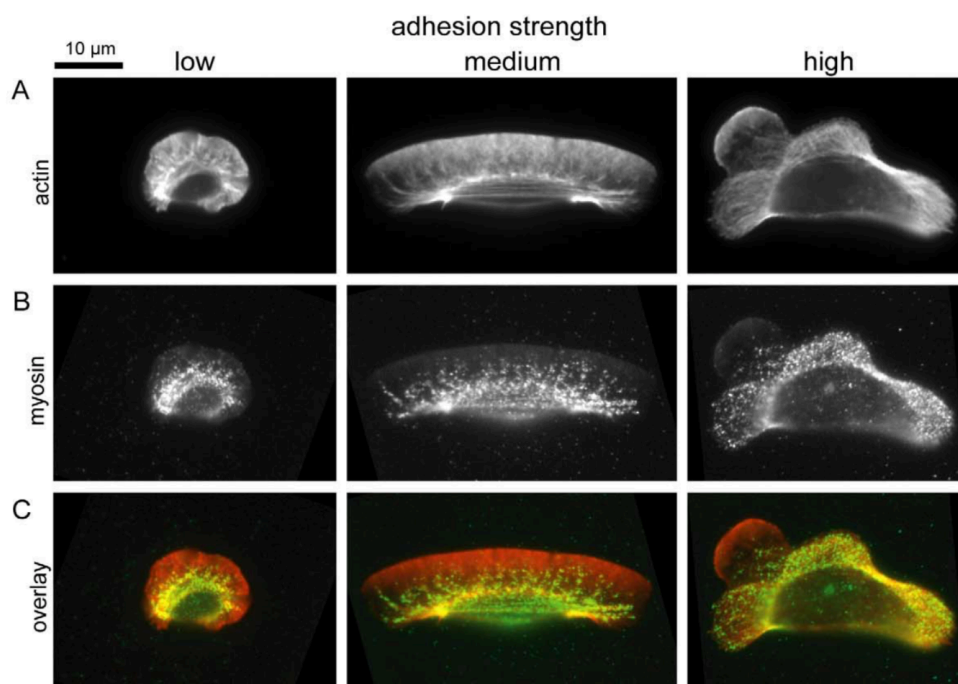


Abbildung 3: Fluoreszenz Bilder von Keratozyten bei unterschiedlichen Adhäsionsstärken. Von links nach rechts; niedrige, intermediäre und hohe Adhäsionsstärke. Aktinfasern sind rot und Myosinfilasern sind grün gefärbt.

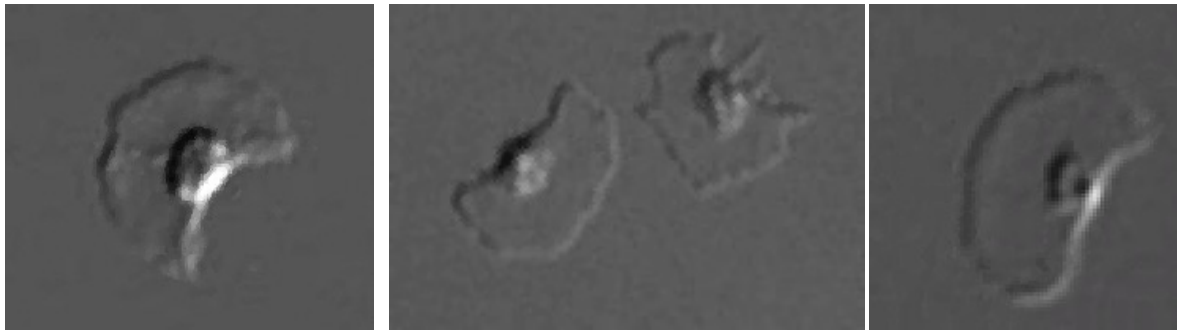
10 μm 

Abbildung 4: Durchlicht mikroskopische (DIC) Bilder von Thrombozyten während der Migration

Die Zellmigration ist abhängig von dem Gleichgewicht multipler Einflüsse, wie die Fortbewegung mittels Aktinfasern, Membranspannung, der Retraktion der Aktinfasern in Folge der Myosinkontraktion und Zell-Substrat-Adhäsion (Cohen, 1979). Das im Folgenden beschriebene Modell mit Keratozyten zeigt uns, dass die Zytoskelettelemente Aktin und Myosin essenziell für die Zellmotilität sind.

Die Zellmembran limitiert die Ausbreitung der Zellen auf dem Substrat, weil die Spannung in der Zellmembran die Polymerisation der Aktinfilamente in der Peripherie inhibiert (Raucher and Sheetz, 2000). Mittels der Verknüpfung der Aktinfilamente (F-Aktin), und zellulärer Mikrofilamente, mit Aktin-bindenden Proteinen wie α -Aktinin, Filamin und Myosin-II entsteht ein Netzwerk (Small and Resch, 2005). Mittels dieses Netzwerks übertragen die Zellen die Kräfte von einer Seite der Zelle auf die andere sowie von dem Zellinneren auf die adhäsive Zelloberfläche (Balaban et al., 2001).

1. Aktin

Das Aktin ist ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts vieler unterschiedlichen Zelltypen. Mittels der Polymerisation von Aktin entstehen die Aktinfilamente, Mikrofilamente, welche durch die Verbindungen untereinander komplexere Strukturen wie Aktinbündel und Netzwerke aufbauen können. Die Aktinfilamente (F-Aktin) können sich durch die Polymerisation und Aufbau von Aktinmonomeren (G-Aktin) an freien Enden in beide Richtungen verlängern, wobei die Aktinpolymerisation am Plusende im Verhältnis zu am Minusende deutlich häufiger stattfindet. Die Verlängerung des Aktinfilaments wird fortgeführt, bis die Konzentration der Aktinmonomere eine kritische Grenze erreicht. Ab dieser Grenze findet an das freie Ende

(Plusende) der Aufbau weiterhin statt und gleichzeitig werden Aktinmonomere vom anderen Ende (Minusende) abgebaut (Wegner, 1976). Die Aktinfilamente bilden mit anderen Zytoskelettelementen ein Netzwerk, das eine mechanische Unterstützung schafft, die Zellform bestimmt und die Bewegung an einer Oberfläche ermöglicht.

Aktinstressfasern, die aus Aktinfilamenten, Myosin -und α -Aktinin bestehen, binden durch weitere Aktin-bindende-Proteine an Integrine und können dadurch an der fokalen Adhäsion zwischen Plasmamembran und extrazellulärer Matrix teilnehmen (Cooper, 2013). Aufgrund der Verbindung zwischen dem Plusende von Aktinstressfasern mit der Membranoberfläche werden alle Anspannungen (Tensions) mittels Myosinkontraktion an die Oberfläche weitergeleitet (Pollard, 1981).

2. Myosin

Das Myosin-II ist ein Motorprotein, das zusammen mit Aktin den Zellkontraktionsapparat bildet (Adelstein and Conti, 1975). Myosin-IIA ist die in Thrombozyten hauptsächlich vorkommende Isoform (Maupin et al., 1994). Die Anomalien von Myosin-IIA werden von einer Gruppe autosomal dominanter Punktmutationen des MYH9-Gens verursacht, die mit Thrombozytopenie und Blutungen assoziiert sind. Dazu werden die May-Hegglin-Anomalie, das Sebastian-, das Fechtner- und das Epstein-Syndrom gezählt (Seri et al., 2000). Die Thrombozyten der betroffenen Patienten weisen einen Defekt in der Zytoskelettorganisation auf, der die Formänderung, das Anheften und die Ausbreitung an der Oberfläche schwächt, wobei die Thrombozytenaggregation sowie die Sekretion der Granula-Inhalte unbeeinträchtigt bleiben (Canobbio et al., 2005, Leon et al., 2007).

Die Myosin-II-Aktivität wird durch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Myosinleichtketten (MLC) reguliert. Durch die Phosphorylierung wird die Myosinleichtkette (MLC) aktiviert und es kommt zu einer Kontraktion des Aktin-Myosin-Netzwerks. Hingegen wird die Myosinleichtkette durch die Dephosphorylierung inaktiviert und es kommt zu einer Relaxation der Zellkontraktionsmaschine. Die Phosphorylierung der Myosinleichtkette ist unter Kontrolle von Myosinleichtkettenkinase (MLCK) und Myosinphosphatase (mPP), welche wiederum von Calcium/Calmodulin und Rho-Kinase reguliert werden (Totsukawa et al., 2004). Rock (RhoA-Kinase I) aktiviert das Myosin-II durch die Phosphorylierung der MLC und durch die Inhibierung der Dephosphorylierung von MLC mittels Inaktivierung von MLC-Phosphatase (MLCP) (siehe Abbildung 5) (Chang et al., 2007).

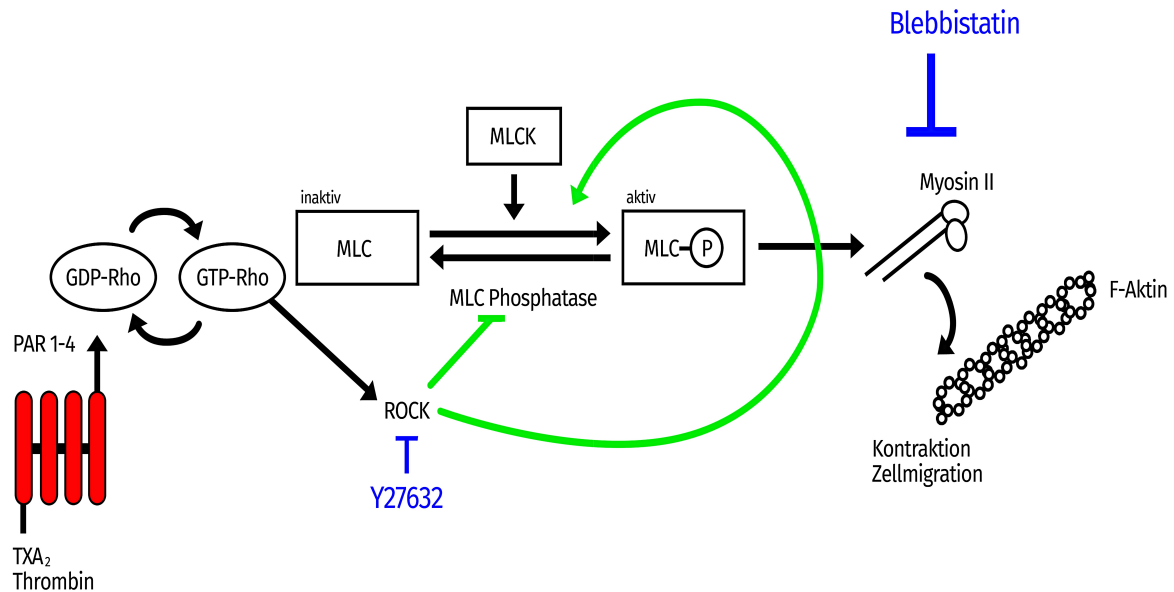


Abbildung 5: Rho-Rock-Kaskade und Regulation der Myosinaktivität

Die Aktivierung des Zellkontraktionsmechanismus ist essenziell für mehrere zelluläre Prozesse wie Phagozytose, Zellkontraktion, Zytokinese, Protrusion und Zellmigration (Kureishi et al., 1997). Die Rho/Rock-Signalkaskade, die von Agonisten wie Kollagen und ADP aktiviert wird, ist an der Formänderung der Thrombozyten mittels der Aktivierung der MLC beteiligt (Bauer et al., 1999). Bei einer Inhibierung von Myosin II können die Zellen sich auf dem Substrat ausbreiten aber es kommt zu einer Unterbrechung der Zellmembrankontinuität und es entstehen Zellfragmente. Die Fenestration, die entstandenen Lücken in der Zellmembran, sind Folge von struktureller Schwäche des Aktin-Zytoskeletts. In Abwesenheit der Myosin-Aktivität kann das Zytoskelettnetzwerk, das die Zelle und das Lamellipodium zusammenhält, nicht gebildet werden und die Zelle verliert ihre zytoplasmatische Kohärenz (Cai et al., 2010). Weiterhin generiert das Myosin-II die Aktinstressfasern, die für die Bildung eines stabilen Thrombus erforderlich sind (Calaminus et al., 2007). Um die Funktion vom Myosin-II zu untersuchen, sind mehrere spezifische Inhibitoren hergestellt worden: Blebbistatin – ein direkter Myosin-II-Inhibitor –, Y27632 (ein Rock-Inhibitor), TAT-C3 (ein RhoA-Inhibitor) und MLCK-Inhibitor. Blebbistatin inhibiert nicht die MLC-Phosphorylierung aber hält das Myosin-II in einer niedrigen Affinität für Aktin (Allingham et al., 2005).

Die RhoA-Kinase spielt eine wichtige Rolle in der Thrombozytenfunktion durch die Bildung fokaler Adhäsionskomplexe (Leng et al., 1998) und Aktinstressfasern in adhären Thrombozyten (Calaminus et al., 2007). Aus der Inhibierung der RhoA-Kinase resultiert eine Insta-

bilität der Thrombozyten-Matrix und Thrombozyten-Thrombozyten-Interaktionen und dadurch ein Defekt im Thrombuswachstum (Schoenwaelder et al., 2002).

3. Mikrotubuli

Mikrotubuli sind röhrenförmige Filamente aus Proteinen, die sich als Heterodimere aus α - und β -Tubulin zusammensetzen. Sie besitzen zwei Enden mit unterschiedlichen elektrischen Ladungen, ein Minus-Ende und ein Plus-Ende. Die Mikrotubuli sind in der Zellmitte mit ihrem Minus-Ende (über das α -Tubulin) an ein Mikrotubulus-Organisationszentrum gebunden, welches sich in der Nähe der Nuklearmembran befindet. Dadurch bildet das Minus-Ende eine stabile Startstelle und die Protofilamente wachsen in Richtung des Plus-Endes in die Zellperipherie. Die Mikrotubuli sind dynamische Filamente, die eine dynamische Instabilität haben, welche durch die Simultanität von Aufbau und Abbau an den Plus-Enden charakterisiert ist (Mitchison and Kirschner, 1984).

Die Mikrotubuli gehören wie die Aktinfilamente zu den Zytoskelettelementen und spielen eine wichtige Rolle in mehreren Zellprozessen. Dazu zählen der Transport von Granula-Inhalten, die Zellmigration (Goldman, 1971, Small et al., 2002), die Zellteilung, die zelluläre Signaltransduktion, die Absorbierung des mechanischen Stresses (Brangwynne et al., 2006) und die Zellverformung (Goldman et al., 2008). Die Mikrotubuli sind für die Erhaltung der Form der Thrombozyten sowie für deren Wiederherstellung nach einer Stimulation zuständig (White and Rao, 1998).

Die Mikrotubuli spielen eine Rolle in der gerichteten Zellmigration großer Zellen wie der Fibroblasten, der Endothelzellen und der Monozyten. Die gerichtete Zellmigration läuft in mehreren Schritten ab: dazu gehören die Umstellung des Mikrotubulus-Organisationszentrums für die Richtungsgebung und die Aktivierung der Zellkontraktionsmaschine aus Aktin und Myosin für die Translokation (Gotlieb et al., 1983).

Der Polymerisationszustand der Mikrotubuli ist mit dem Aktivierungszustand von RhoA gekoppelt (Hall, 1998). Durch diese Koppelung beeinflussen die Mikrotubuli die Phosphorylierung und die Aktivitätsrate der Myosinleichtketten (Kolodney and Elson, 1995, Verin et al., 2001). Die Depolymerisierung durch Spaltung der Mikrotubuli verstärkt die Bildung von Aktinstressfasern und damit die Zellkontraktion (Chang et al., 2008, Verin et al., 2001).

Eine der wichtigsten Funktionen der Mikrotubuli ist die Bildung und Erhaltung der Zellpolarität, damit die Zelle die mittels der Zellkontraktionsmaschine gebildete Migrationskräfte für

eine unidirektionale Lokomotion benutzen kann (Vasiliev, 1991, Singer and Kupfer, 1986). Daher ist die partielle und selektive Stabilisierung der Mikrotubuli in Richtung der Migration äußerst wichtig für die Erhaltung der Richtung (Gundersen and Bulinski, 1988). Durch diese selektive Stabilisierung werden die Organellen und die Granula-Inhalte in Richtung der Migration transportiert und dort freigesetzt, was die Erweiterung und die Vergrößerung der Zelle an der Vorderkante ermöglicht (Kupfer et al., 1982). Bei Abwesenheit der Mikrotubuli können die Zellen sich nicht polarisieren und streben so danach, gleichzeitig in mehrere Richtungen zu migrieren.

Da die Mikrotubuli für die Zellteilung mittels Mitose essenziell sind, wurden im Laufe der letzten Jahrzehnte für die Therapie verschiedener Karzinome mehrere Mikrotubuliinhibitoren entwickelt. Die Mikrotubuli-bindenden Wirkstoffe teilen sich in zwei Gruppen; eine Gruppe führt zur Polymerisierung und Stabilisierung der Mikrotubuli (Taxane), die andere Gruppe dagegen zur Depolymerisierung und Destabilisierung (Colchicine und Vincaalkaloide) (Vasiliev et al., 1970).

Mikrotubuliinhibitoren hemmen die Mitose durch die Suppression der Dynamik an den Plus-Enden (Jordan and Wilson, 2004). Die Verhinderung der Zellmigration durch die Mikrotubuliinhibitoren kann auch mit dem selben Wirkprinzip erklärt werden (Pourroy et al., 2006). Die Mikrotubuliinhibitoren haben eine konzentrationsabhängige Wirkung: Bei geringer Konzentration verhindern sie die Zellmigration und die Dynamik und bei hoher Konzentration die Zellteilung (Schwartz, 2009). Die Suppression der Dynamik an Plus-Enden führt zu mehr statischen Mikrotubuli, die ihre Fähigkeit zu einer Zellformveränderung verlieren (Yang et al., 2010).

Bei einer Depolymerisation der Mikrotubuli von Fibroblasten mit Colcemid werden alle Zellteile einheitlich aktiv, was die Translokation ineffektiver macht (Vasiliev et al., 1970). Colchicine, die sich an die Mikrotubuluswand binden (Borisy and Taylor, 1967), haben keinen Effekt auf die ungerichtete Migration, aber inhibieren die gerichtete Migration. Die intakten Mikrotubuli sind essenziell für die Bildung von Pseudopodien und für die unidirektionale Migration während der Chemotaxis (Malech et al., 1977).

1.4 Der Serumfaktor

Das Blutserum ist der flüssige Überstand, der nach einer stattgefundenen Gerinnung des Vollblutes übrig bleibt. Es besteht zu etwa 91 % aus Wasser, zu 7 % aus Proteinen und zu 2 % aus übrigen Bestandteilen wie Elektrolyten, Hormonen, Nähr- und Abfallstoffen. Albumin hat den größten Anteil an den Proteinen mit 62 %.

In in-vitro-Studien beobachteten wir, dass es bei einer Aktivierung der Thrombozyten durch Gerinnungsaktivatoren in Abwesenheit von Serum zum Ausbleiben der Thrombozytenmigration kommt. Dies ließ vermuten, dass eine oder mehrere Serumbestandteile in der Aktivierung und Migration der Thrombozyten eine essenzielle Rolle spielen (siehe Abbildung 25).

Proteine:

Albumin und Casein

Serumalbumin wird in der Leber produziert und zirkuliert in der Blutbahn. Die Hauptrolle von Albumin ist die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks. Albumin kann an metabolische Produkte, regulatorische Mediatoren, Nährstoffe und Proteine binden und sie in der Blutbahn transportieren. Zusätzlich kann Albumin an endo- und exogene Toxine binden und sie neutralisieren (Zilg et al., 1980). In verschiedenen Studien wurde beobachtet, dass Serumalbumin auch in der Zelladhäsion und Zellmigration eine Rolle spielt (Mukherjee and Lynn, 1978).

In Abwesenheit von Proteinen findet die von SDF-1 vermittelte Migration von hämatopoetischen Stammzellen nicht statt. Durch die Zugabe von Serumalbumin wird die SDF-1-abhängige Migration getriggert. Die tryptische Verdauung oder Azid Hydrolisation der Proteine eliminiert deren migrationsunterstützende Funktion. Für die SDF-1 abhängige Migration werden intakte Proteine benötigt (Ryser et al., 2009).

Albumin beschleunigt die Migration von polymorphonuklearen Leukozyten (PMN) ohne weiteren Effekt auf die Richtung. Das Hinzusetzen von Casein, einem hochmolekularen Protein mit chemotaktischem Effekt, eliminiert den Effekt von Albumin auf die Leukozytenmigration. Die Zelladhäsion bleibt in Anwesenheit von Casein weiterhin abhängig von der Albuminkonzentration (Valerius, 1983).

Albumin hat einen anti-adhäsiven Effekt, welche die adhäsive Wirkung von Integrin-Fibrinogen-Interaktion entgegenwirken kann und damit die Migration unterstützt (Park et al., 1991).

1. Ionen:

Bivalente Kationen wie Calcium, Magnesium und Mangan haben einen regulierenden Effekt auf die Integrinfunktion. Sie können die Integrine stabilisieren oder die Interaktionen zwischen Integrine und Liganden steigern oder supprimieren (Plow et al., 2000). Bivalente Kationen können sich mittels spezieller Verbindungsstellen an $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine verbinden. Eine direkte Wirkung von Mangan auf die Aktivierung von Integrine konnte bereits festgestellt werden. Durch die Erhöhung der Affinität der $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine auf deren Ligand Fibrinogen fördert Mangan die Thrombozytenadhäsion (Smith et al., 1994). Es wurden zwei unterschiedliche Bindungsstellen von $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine für Metallionen identifiziert; eine Bindungsstelle für alle bivalenten Kationen, welche die Integrin-Ligand-Verbindung fördert und eine zweite für Calcium spezifische inhibierende Bindungsstelle, welche die Verbindung zwischen RGD-Ligand und Integrine hemmt (Hu et al., 1996). In früheren Studien mit Fibroblasten konnte eine Konkurrenz zwischen Magnesium und Calcium für die Bindungsstelle von Integrine festgestellt werden, die konzentrationsabhängig ist und die Adhäsion und Migration beeinflusst (Grzesiak et al., 1992).

Calcium

Calcium ist ein wichtiges Sekundärsignal für viele physiologische Prozesse wie Muskelkontraktion, zelluläre Sekretion und Genexpression (Berridge et al., 2003). Zudem ist Calcium in der Zellmigration von mehreren Zellarten wie Neutrophilen, Eosinophilen, glatten Muskelzellen und Neuronen beteiligt. Die Calciumionen verteilen sich in migrierenden Zellen nach einem bestimmten Muster; die Calciumkonzentration ist hoch in der Hinterkante (trailing edge) und niedrig in der führenden Vorderkante (leading edge) der Zelle (Brundage et al., 1991, Xu et al., 2004, Hahn et al., 1992, Yumura et al., 1996).

Die intrazelluläre Calciumkonzentration wird durch zwei Mechanismen gesteigert: mittels der Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern und mittels Calciumeinstroms durch die Calciumkanäle und andere Ionenkanäle auf der Plasmamembran (Berridge et al., 2003). Beide Mechanismen sind je nach Zelltyp mit der Migration gekoppelt (Komuro and Rakic, 1993, Xu et al., 2004, Nebl and Fisher, 1997, Lee et al., 1999). In manchen Zellarten ist der Calcium-

einstrom wichtiger für Zellmigration als die Calciumfreisetzung (Marks and Maxfield, 1990, Lee et al., 1999). Die L-Typ-Calciumkanäle erlauben einen selektiven Calciumeinstrom in Richtung elektrochemischer Gradienten, von einer hohen Calciumkonzentration extrazellulär zu einer niedrigen Calciumkonzentration intrazellulär, um den intrazellulären Calcium-Spiegel zu steigern (Catterall, 2000).

Der Calciumeinstrom vermittelt durch Calmodulin und MLCK die Phosphorylierung von MLC und moduliert dadurch die Aktin-Myosin-Kontraktionskräfte an der Hinterkante von Fibroblasten und führt zur deren Retraktion während der Migration (Yang and Huang, 2005). Die Calciumkanäle sind direkt oder indirekt sensibel gegenüber mechanischer Dehnung (Ruiz-Velasco et al., 1996). Die Dehnung der Zellmembran während der Migration kann die Öffnung der Calciumkanäle und dadurch den vorübergehenden Calciumeinstrom stimulieren (Lee et al., 1999).

Während der Zellmigration kommt es zu einem Vorsprung an der Vorderkante und zu einer starken Adhäsion an der Hinterkante, welche kumulativ die Membranspannung steigern. Über einen Kopplungsmechanismus werden die Calciumkanäle geöffnet. Wenn die Spannung den Schwellenwert erreicht, löst sich die Hinterkante der Zelle von dem Substrat ab und die Zelle zieht sich zusammen. Aufgrund der darauffolgenden Reduktion der Membranspannung schließen sich die Calciumkanäle und der Zyklus fängt von vorne an (Yang and Huang, 2005). Der intrazelluläre Calciumkonzentrationsanstieg ist essenziell für die Verminderung der Adhäsionskräfte und die Lösung der Leukozyten von dem Substrat (Marks and Maxfield, 1990).

Magnesium

In Ruhezustand beinhalten viele Zellen 1-2 mM Magnesium, welche sich mit CIB1 (Calcium- und Integrin-bindendes Protein 1) zusammenbinden können (Huang et al., 2011). CIB1 ist ein Protein, das an der Regulation der Hämostase teilnimmt. Es kann mit der zytoplasmatischen α Ib-Domänen von α Ib β 3-Integrin Verbindungen herstellen, das α Ib β 3-Heterodimer trennen und dadurch α Ib β 3-Integrin aktivieren. Das aktivierte α Ib β 3-Integrin hat eine höhere Affinität zu seinen Liganden Fibrinogen und vWF (Tsuboi, 2002, Huang and Vogel, 2012). CIB1 hat eine instabile Struktur bei Abwesenheit bivalenter Metallionen. Durch die Verbindung mit Calcium- oder Magnesiumionen steigen die strukturelle Stabilität und die Affinität von CIB1 für die α Ib-Domäne (Yamniuk et al., 2004). Sowohl Ca-CIB1 als auch Mg-CIB1 können mit α Ib β 3-Integrin in hoher Affinität und mit ähnlichem Mechanismus interagieren (Yamniuk

and Vogel, 2005). Aufgrund hoher Magnesiumkonzentration im Zellinneren kommt CIB am häufigsten mit Magnesium verbunden vor und kann potentiell von Calcium ersetzt werden, wenn ihre Konzentration nach dem Einstrom in die Zellinnere ansteigt (Yamniuk et al., 2004). Außer der Wirkung über CIB kann Magnesium konzentrationsabhängig die Agonisten der Thrombozytenaggregation wie ADP, Thromboxan, Thrombin und Kollagen inhibieren (Hwang et al., 1992).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Auf die in der Einleitung zusammengefassten Grundlagen aufbauend befasst sich die vorliegende Arbeit mit folgenden Fragestellungen:

1. Wie ist die Integrin-GPIIb/IIIa-Aktivität mit der Thrombozytenmigration verknüpft?
2. Welche Rolle spielen die Zytoskelettelemente in der Thrombozytenmigration?
3. Welche Bestandteile des Serums sind für die Thrombozytenmigration notwendig?

2 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden Versuchsaufbau und Auswertung detailliert beschrieben.

2.1 Thrombozytenisolation

Die Thrombozytenisolation erfolgte aus venösem humanem Vollblut nach dem folgenden Protokoll (Massberg et al., 2003). Die Probanden waren gesunde Personen, die keine Gerinnungsstörungen hatten und keine blutverdünnenden Medikamente nahmen.

2.1.1 Präparation des ACD Vollblutes

Um die Thrombozytenaggregation während der Isolation zu verhindern, wurden vor der Blutabnahme 5 ml Spritze mit 714 μ l Acid-Citrate-Dextrose (39 mM Zitronensäure, 75 mM Natriumcitrat, 135 mM D-Glucose; ACD), einem Antikoagulans, gefüllt. Die Benutzung von ACD als Antikoagulans wurde wegen der längeren und besseren Thrombozytenstabilität im Vergleich zu EDTA und Heparin bevorzugt. Nach der venösen Punktion wurden zuerst mit einer 2 ml Spritze Blut abgenommen, welches verworfen wurde, um die Verfälschung während der Gefäßpunktion durch die Aktivierung der Thrombozyten zu beseitigen. Danach wurde die mit ACD vorgefüllte 5 ml Spritze langsam komplett gefüllt und leicht geschwenkt. Dadurch wurde ein Verhältnis von ACD zu Vollblut 1:7 erreicht.

2.1.2 Erstellung des Tyrodes-Puffers

Der Tyrodes-Puffer wurde zur 1:1 Verdünnung des Vollblutes gebraucht. Die Zusammensetzung vom modifizierten Tyrodes-Puffer bestand aus BSA 0,1 % (bovines fettsäurefreies Albumin, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Glucose 0,1 % (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 10 ml Tyrodes 10-fach Puffer und 1 ml Hepes 10 mM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) nach einer 1:10 Verdünnung im destillierten Wasser. Der 10-fach konzentrierte Tyrodes-Puffer wurde aus 80 g NaCl (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), 10,15 g NaHCO₃ (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland), 1,95 g KCl (Fa. VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 1000 ml Aqua bidest hergestellt und nach einer Sterilfiltration im Kühlschrank (Liebherr

Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen, Deutschland) bei 4 °C gelagert. Nach der Erstellung des Tyrodes-Puffers wurde der pH-Wert durch ein pH-Meter (Inolab®, pH 7110) bestimmt. Mittels Pipettierung von Natronlauge und Salzsäure wurde der pH-Wert auf 6,5 und 7,2 titriert und die Lösungen wurden jeweils in einen 50 ml Falcon (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) eingefüllt.

2.1.3 Präparation des plättchenreichen Plasmas (PRP) und der gewaschenen Plättchen (WP)

Das ACD-Vollblut wurde langsam in ein 15 ml Falcon umgefüllt und mit Tyrodes-Puffer mit einem pH-Wert von 6,5 auf 10 ml aufgefüllt, wodurch das Vollblut 1:1 mit dem Puffer verdünnt wurde. Dieses mit Vollblut gefüllte Falcon wurde bei 20-25 °C mit 600 rpm (70 rcf) für 20 Minuten zentrifugiert. (Zentrifuge: Eppendorf 5804R, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland/Heraeus Sepatech Megafuge 1.0, Hanau, Deutschland) Bei der ersten Zentrifugation wurde keine Bremse verwendet, um die durch Wirbelungen verursachte Verschiebung der Separationsgrenze zu verhindern. Der Überstand, der aus plättchenreichem Plasma (PRP) bestand, wurde vorsichtig abpipettiert und leicht in einem neuen Falcon geschwenkt. Ein Teil vom PRP wurde für die Bestimmung der Thrombozytenanzahl mittels Zellzähler (Sysmex KX-21N™ Automated Hematology Analyzer, Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland) abgenommen. 3 mL PRP wurden mit 10 µl Prostazyklin (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) und 7 ml Tyrodes (pH 6,5) gemischt. Prostazyklin (Prostaglandin I₂) wurde während der Präparation für die Hemmung der Thrombozytenaktivierung benutzt.

Die zweite Zentrifugierung fand bei 20-25 °C mit 2500 rpm (1200 rcf) mit Bremse für 10 Minuten statt. Der Überstand wurde abgekippt und das Pellet blieb am Boden des Falcons, das in 1 ml Tyrodes (pH=6,5) vorsichtig suspendiert wurde. Dadurch wurden die gewaschenen Thrombozyten (WP) erhalten – das Standardmaterial für alle Versuchsreihen. Die genaue Anzahl der gewaschenen Thrombozyten wurde mit Hilfe des Zellzählers (Sysmex KX-21N™ Automated Hematology Analyzer, Sysmex GmbH, Norderstedt, Deutschland) automatisch bestimmt (siehe Abbildung 6).

Die Thrombozytenisolation mit Erstellung des Puffers wurde von der Arbeitsgruppe etabliert und in meinen Versuchsreihen weiter benutzt.

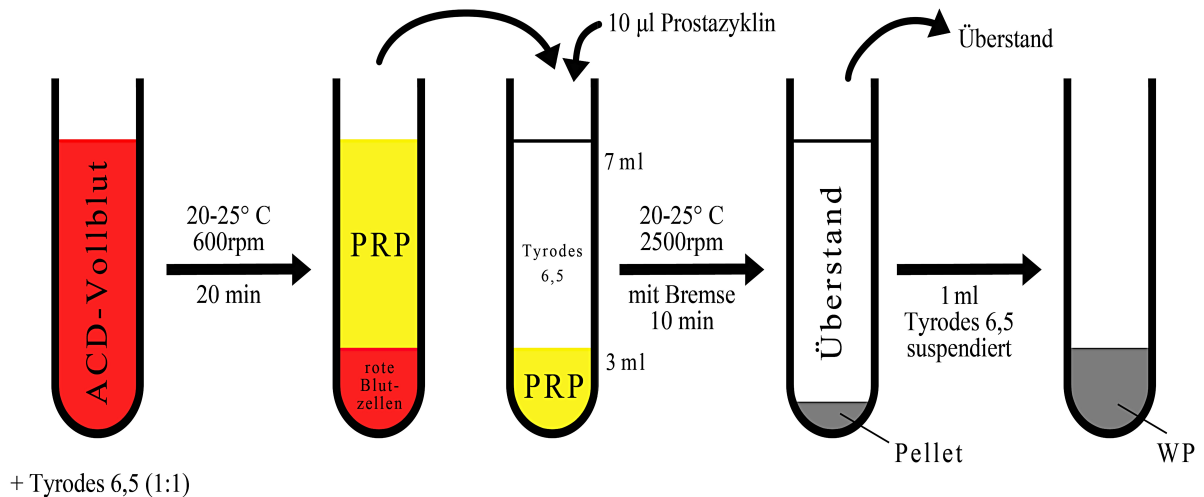


Abbildung 6: Thrombozytenisolation

2.2 In-vitro-Analyse der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenmigration

Für die Durchführung der Versuche werden die isolierten Thrombozyten (WP), die im Tyrodes-Puffer (pH 7,2) verdünnt sind, Fibrinogen und Serum, die für die Thrombozytenadhäsion an der Oberfläche zuständig sind, benötigt. Für die Aktivierung der Thrombozyten wurden ADP und Thromboxan verwendet. Alle diese Substanzen wurden auf die Deckgläser eingebracht, die mit einer speziell für die Thrombozytenmigration etablierten Methode vorbehandelt wurden (siehe Abbildung 7). Im Folgenden werden die verwendeten Methoden genauer beschrieben.

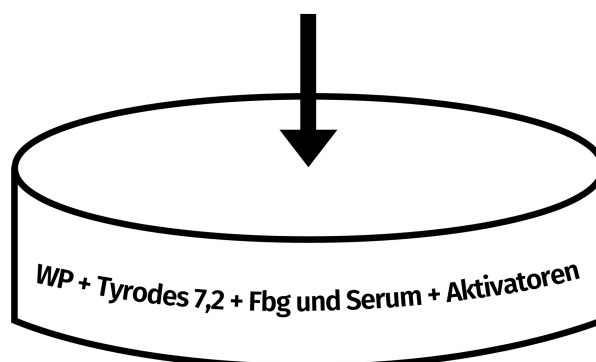


Abbildung 7: Standardkontrollversuch

2.2.1 Glas als Oberfläche

Als Oberfläche der in-vitro-Versuche wurden die Schott Nexterion Slides (Nextrione® Glass D Coverslip uncoated, Größe $24.0 \times 24.0 \pm 0.20$ mm, Dicke 0.175 ± 0.015 mm, Schott Technical Glass Solutions GmbH, Mainz, Deutschland) benutzt. Es ist bekannt, dass Materialien wie eine Glasoberfläche durch ihre Interaktion mit Thrombozyten deren Funktion beeinflussen können (Gorbet and Sefton, 2004). Aufgrund solcher Interaktionen sollten die Coverslips mit unterschiedlichen Methoden vorbehandelt werden, um solche Einflüsse so weit wie möglich zu vermeiden und neutrale, den in-vivo-Versuchen nahestehende Bedingungen zu schaffen.

Wenn Biomaterialien mit biologischen Flüssigkeiten (z. B. Blut, Blutbestandteilen wie Serum oder andere Körperflüssigkeiten) in Kontakt kommen, bilden sich Wassermoleküle auf der Oberfläche. Diese binden sich schnell an die Oberfläche und es entsteht eine Wasserschicht aus ein oder zwei Lagen. Diese spezifische Anordnung der Wassermoleküle ist abhängig von der Oberflächeneigenschaft auf atomarer Ebene. Die hoch reaktiven Oberflächen führen zu einer Dissoziation des Wassermoleküls. Im Gegenteil dazu können die niedrig reaktiven Oberflächen mittels Hydrogenbindung mit Wassermolekülen interagieren und die Wassermoleküle bleiben dabei intakt. Oberflächen, die eine von diesen beiden Eigenschaften besitzen, werden benetzend und hydrophil genannt, während Oberflächen, die eine leichte Tendenz zur Verbindungen mit Wassermoleküle zeigen, nicht benetzend und hydrophob genannt werden (Michaelis et al., 2012).

Der Einfluss der Oberflächeneigenschaften insbesondere der Benetzbarkeit wurde in verschiedenen Studien erforscht. Generell haften die Zellen an dem Substrat mit hoher Benetzbarkeit fester als an dem Substrat mit niedriger Benetzbarkeit an (van Kooten et al., 1992). Die hydrophilen und hydrophoben Oberflächen haben unterschiedliche Tendenzen zur Bindung an Proteine, welche die Liganden von Integrinen auf der Zellmembran sind. Diese unterschiedlichen Tendenzen sind direkt mit der Stärke der Thrombozytenadhäsion an der Oberfläche korreliert. Während sich mehrere Studien auf die Adhäsion unterschiedlicher Zellen wie Fibroblasten oder Endothelzellen konzentrieren, gibt es wenige Studien über den Einfluss der Oberflächenbeschaffenheit auf die Migration. In einer von diesen wenigen Studien über die Interaktion zwischen den Fibroblasten und dem Oberflächen wurde gezeigt, dass die hydrophilen Oberflächen im Vergleich zu den Hydrophoben die Zelladhäsion und Ausbreitung (spreading) begünstigen, während sie die Zellmigration verhindern. Hingegen haben die Zellen auf einer hydrophoben Oberfläche zwar eine niedrigere Adhäsionstendenz, aber eine hohe

Migrationsrate (Shen et al., 2012). In einer weiteren Studie wurde der Einfluss unterschiedlicher funktioneller Gruppen des Oberflächenmaterials auf die Proteine und die Zellen dargestellt. Diese zeigte, dass die CH_3 -Gruppe, die auch durch Hexamethyldisilazan (HMDS) freigesetzt wird, zu einer stärkeren Leukozytenadhäsion und gleichzeitig zu einer Phagozytenmigration führt. (Schmidt et al., 2000)

2.2.2 Etablierung der HMDS-Beschichtung

Das Ziel der Versuche war die Darstellung der Migration von Thrombozyten und die Beobachtung der Einflüsse verschiedener Mediatoren auf deren Migration. In den ersten Versuchsreihen mit Schott Nexterion Glasslides ohne Vorbehandlung zeigten die Thrombozyten unterschiedliche Adhäsion- und Migrationsverhalten. Es wurde beobachtet, dass die Thrombozyten sich in der Mitte des Slides anhäuften. Ein großer Anteil davon blieb adhärent und nur wenige davon konnten migrieren. In mehreren Versuchen wurden die Thrombozyten weiter beobachtet und es wurde festgestellt, dass keine einheitlichen Ergebnisse produzierbar waren. Da die Migration in unseren Versuchen im Vordergrund lag, musste eine in-vitro-Methode etabliert werden, welche uns die beste Möglichkeit bot, die Migration näher zu betrachten. Um diese Herausforderung zu verwirklichen beschichteten wir die Glasslides mit unterschiedlichen Substanzen. Wie im vergangenen Kapitel erwähnt, können die Zellen auf einer hydrophoben Oberfläche besser migrieren. Aus diesem Grund wurden die Coverslips mit Hexamethyldisilazan (HMDS) vorbehandelt.

Hexamethyldisilazan (HMDS) ist eine bei Zimmertemperatur flüssige Verbindung, die für die Umwandlung hydrophiler in hydrophobe Oberflächen benutzt wurde. Die Hydrophobierung mittels HMDS erfolgte durch die Ersetzung der $-\text{OH}$ -Verbindung an der Oberfläche durch eine $-\text{CH}_3$ -Verbindung. Durch diese Ersetzung wurde der Kontaktwinkel zwischen biologischer Flüssigkeit und Oberfläche geändert. Je größer der Kontaktwinkelgrad ist, desto hydrophober ist die Oberfläche (Chang and Wang, 2011).

Während der Etablierung der Vorbehandlung von Coverslips wurden verschiedene Techniken getestet: Zuerst wurden die Coverslips für die Säuberung mit Salpetersäure (HNO_3 20 %) gewaschen. Es wurde keine Thrombozytenadhäsion auf den mit Säure gewaschenen Coverslips beobachtet (siehe Abbildung 8). Als Zweites wurden die Coverslips mit Salpetersäure (HNO_3 20 %) gewaschen, für 15 Minuten bei $150\text{ }^\circ\text{C}$ im Ofen gebacken und als Letztes mit HMDS beschichtet. Wir vermuten, dass infolge der Hitzebehandlung die Wasserverbindungen frei werden. Deswegen sollte diese Hitzebehandlung die Verbindungsrate von HMDS an die

Oberfläche erhöhen und dadurch eine homogene Beschichtung mit HMDS ermöglichen. Nach diesem Prozess waren die Thrombozyten adhärenter, aber sie zeigten eine niedrigere Migrationsrate (siehe Abbildung 8). Die homogene Beschichtung mit HMDS sowie die homogene Beschichtung mit H₂O waren für die Migration offenbar nicht optimal. Der Grund dafür kann der unterschiedliche Bindungstendenz von Fibrinogen und der Serumproteine an Wassermolekülen oder an HMDS sein. Deswegen wurden die Coverslips mit Salpetersäure (HNO₃ 20 %) gewaschen und ohne zusätzlicher Backprozess mit HMDS beschichtet. Auf diesen Coverslips zeigte sich das beste Ergebnis: Es konnte eine Thrombozytenadhäsion und -migration beobachtet werden (siehe Abbildung 8).

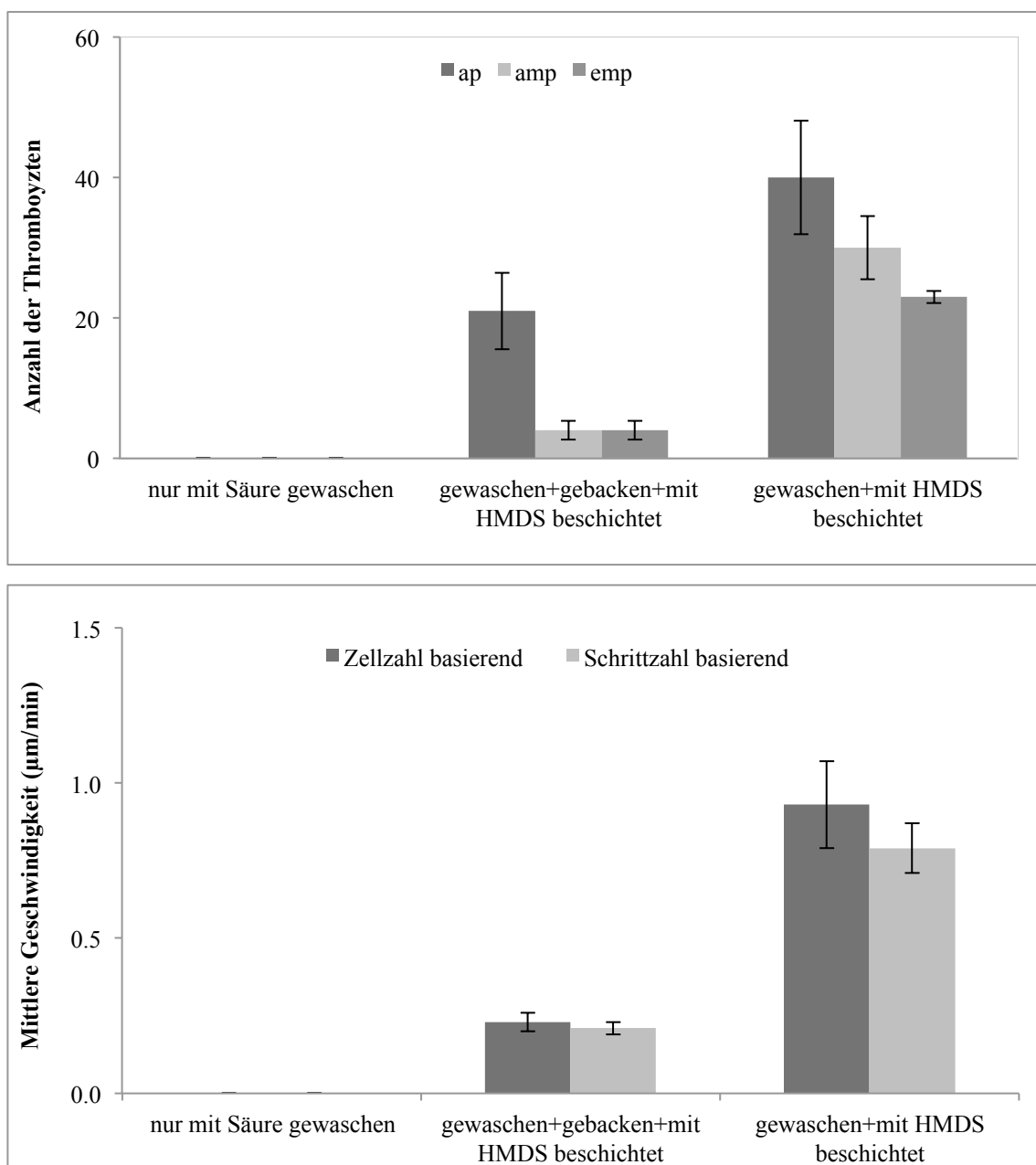


Abbildung 8: Wirkung der Vorbehandlung von Slides auf die Thrombozytenmigration. Darstellung der Anzahl von adhärenenten (ap) sowie einzeln (emp) und alle (amp) migrierenden Thrombozyten abhängig von dem Behandlungsprozess der Slides (oben). Darstellung der Geschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$ basierend auf Zell- und Schrittzahl abhängig von dem Behandlungsprozess der Slides (unten).

Dieser neuen etablierten Methode folgend wurden die Coverslips zuerst senkrecht in einen mit Salpetersäure (HNO_3 20 %) gefüllten Behälter platziert und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Tischrüttler (GFL 3006, Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 100/min geschüttelt. Danach wurden die Coverslips aus dem Behälter einzeln herausgenommen und dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Alle Coverslips wurden erneut in dem Behälter platziert, welcher dieses Mal mit destilliertem Wasser gefüllt wurde. Die Coverslips wurden für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur im destillierten Wasser gelassen und mit einer Geschwindigkeit von 100/min auf dem Tischrüttler geschüttelt. Nachdem der Waschprozess mit destilliertem Wasser beendet war, waren die Coverslips für die Beschichtung bereit.

Die Beschichtung der Coverslips erfolgte mit Hexamethyldisilazan (HMDS Reagenz grade $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), eine chemische Flüssigkeit, die für die Oberflächenmodifikationen verschiedener Festmaterialien benutzt wurde. Die Coverslips wurden zunächst für das Abtrocknen mit Spincoater (SCI Spin Coater, Novocontrol Technologies GmbH & Co. KG, Montabaur, Deutschland) bei einer Geschwindigkeit von 90 rps für 10 Sekunden geschleudert. Um die Coverslips homogen zu beschichten, wurde auf ihre Oberfläche HMDS pipettiert und sie wurden mit Spincoater bei einer Geschwindigkeit von 80 rps für 30 Sekunden geschleudert (siehe Abbildung 9) (Hellstrom, 2007).

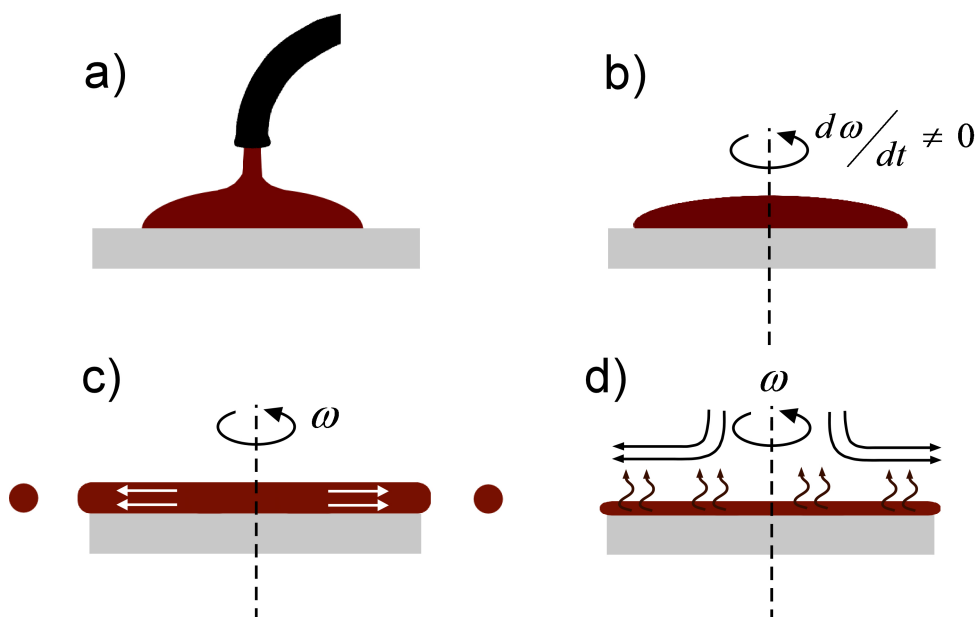


Abbildung 9: Die Phasen von Spin coating/ Beschichtung.

a) Die Gabe der Flüssigkeit, b) Die Beschleunigung, c) Spin coating, d) Die Verdunstung. (Hellstrom, 2007)

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Beschichtungsmethode mit HMDS, die in Gaertner et al Cell 2017 publiziert wurde, diente als experimentelle Grundlage der in-vitro Versuche.

2.2.3 Präparation des Serums

Für die Serumpräparation wurde das ACD-Vollblut – genauso wie bei der Thrombozytenisolation – in eine 5 ml Spritze venös abgenommen und mit Tyrodes-Puffer (pH 6,5) 1:1 verdünnt. Das mit Vollblut gefüllte Falcon wurde bei 20-25 °C mit 4000 rpm mit Bremse für 15 Minuten zentrifugiert. Insgesamt 7 ml des Überstandes, der aus Plasma bestand, wurde in ein neues Falcon überführt. Dazu wurde 70 µl Thrombin pipettiert und die Mischung wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach 30 Minuten bildete sich am Boden des Falcons ein Gel, das durch die Spaltung von Fibrinogen in Fibrin mittels Thrombin entstand. Dieses Fibringel wurde vorsichtig von der Falconwand entfernt. Mit dem restlichen Plasma fand die zweite Zentrifugation bei 20-25 °C mit 4000 rpm mit Bremse für 10 Minuten statt. Von dem Serum wurden 3 ml abgenommen und in einem neuen Falcon mit PPACK (D-Phenylalanin-L-Prolin-L-Arginin-Chloromethylketon) und Lepirudin zusammengemischt (Lachmann, 2010).

Lepirudin ist ein gentechnisch hergestelltes r-Hirudin und PPACK ist ein selektiver Thrombin-Inhibitor. Beide sind Antikoagulanzen, die sich an Thrombin binden und dessen prokoagulatorische Wirkung inhibieren. Für die Serumpräparation wurde 2 U/ml Lepirudin (Refludan, Celgene GmbH, München, Deutschland) und 40 µM PPACK (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland) in das Plasma eingesetzt. Da bei einigen Versuchen eine Serum-Thrombozyten-Inkompatibilität beobachtet wurde, wenn das Serum und die Thrombozyten vom Blut verschiedener Probanden präpariert wurde, wurde einmalig das präparierte Serum in kleine Tuben (Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH) verteilt und im Kühlschrank bei -20 °C gelagert, um eine Standardisierung zu erreichen. Die Serumpräparation erfolgte nach dem voretablierten Protokoll der Arbeitsgruppe.

Aufgrund des weiterhin bestehenden Effekts vom Probandenwechsel wurde für die Eliminierung dieses Einflussfaktors für eine weitere Standardisierung des Serums entschieden. Dafür wurde bei den Versuchsreihen humanes Komplement-Serum (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Die Überlegung, dass die Komplementfaktoren bei der Thrombozytenmigration eventuell eine Rolle spielen könnten, leitete dazu. Die Thrombozyten können von den Komplementfaktoren über unterschiedliche Wege aktiviert werden (Gorbet and Sefton, 2004). Bei der Serumpräparation könnten die Komplementfaktoren verbraucht werden, deswegen wurde humanes Komplement-Serum ausgewählt, welches alle Komplementfaktoren beinhaltet. Humanes Komplement-Serum wurde im Kühlschrank bei -20 °C gelagert. Für die Versuche wurde das Serum im destillierten Wasser aufgelöst. Die für die Serumpräparation verwendeten Substanzen sind in der folgenden Tabelle gelistet (siehe Tabelle 1).

Substanz	Nr./Firma	Konzentration	Lösungsmittel	Vorverdünnung
Bovines Thrombin	#T4648, Sigma-Aldrich	10 mg/ml= 0,2 U/ml	H ₂ O	keine
Lepirudin/Refludan	Celgene	160.000 U/ml	PBS	1:100
PPACK	#SC202191, Santa Cruz	22.200 µM	H ₂ O	keine
Humanes Komplement-Serum	#S1764, Sigma-Aldrich	1,125 mg/ml	H ₂ O	keine
Prostazyklin	#18220, Cayman Chemical	10 mg/ml	PBS, pH 9	1:100

Tabelle 1: Substanzen für Serum- und Thrombozytenpräparation

2.2.4 Das Kontrollversuchsprotokoll

Nach der Thrombozytenisolation und der Beschichtung der Coverslips mit HMDS wurden die für den Versuch verwendeten Substanzen zusammengesetzt. Zuerst wurden die Coverslips an einem kreisförmigen Deckel, der ein Loch in der Mitte hat, mit Paraffin befestigt. Dadurch entstand eine kreisförmige Migrationskammer mit einem HMDS-beschichtetem Coverslip (Deckglas) als Oberfläche. Darauf wurden der Reihe nach folgende Substanzen pipettiert: Tyrodes-Puffer (pH 7,2), humanes Fibrinogen 154 µg/ml, humanes Komplement-Serum 1,125 mg/ml, gewaschene Plättchen (WP), ADP 4,2 µM und Thromboxan (U46619) 2,4 µM. Für den Kontrollversuch wurden die Stoffe in folgenden Konzentrationen eingesetzt: ADP 0,2 mM, Thromboxan 288 µM und humanes Komplement-Serum 16,8 µg. Die Thrombozyten wurden so eingesetzt, dass sie eine Endkonzentration von 10×10^3 /µl haben und der Rest wurde mit dem Tyrodes-Puffer gefüllt. Die Konzentration verschiedener Substanzen ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst (siehe Tabelle 2).

Substanz	Nr./Firma	Konzentration	Lösungsmittel	Verdünnung
Humanes Fibrinogen	#F4883, Sigma-Aldrich	2 mg/ml	NaCl	keine
ADP	#A2754, Sigma-Aldrich	0,1 g ADP in 11,7 ml = 20 mM	PBS	1:40
U46619 (Thromboxan A2)	#BML-PG023-0001, Enzo	10 mg/ml = 28,8 mM	PBS	1:100

Tabelle 2: Substanzen für die Aktivierung der Thrombozyten

2.3 In-vitro-Analyse der Rolle von Integrin-Ligand-Komplexen auf die Thrombozytenmigration

Bei der Wirkung der Integrin-Ligand-Komplexe auf die Thrombozytenadhäsion und -migration wurde der GPIIb/IIIa-Komplex in den Blick genommen. Die Verbindungsdomäne zwischen Fibrinogen und dem Integrin α IIb β 3, die RGD-Sequenzen, wurden mit den RGD-

Peptiden blockiert. Für die Inhibierung wurde RGDS (H-Arg-Gly-Asp-Ser-OH, US Biological, Massachusetts, USA) und für die Kontrollversuche zu dem RGDS wurden RGES (H-Arg-Gly-Glu-Ser-OH, Bachem Ag, Bubendorf, Schweiz) und H₂O verwendet. Die Substanzen wurden wie beim Standardversuch in folgenden Konzentrationen eingesetzt: RGDS 100 µM und 200 µM, dementsprechend für die jeweiligen Kontrollversuche RGES 100 µM und 200 µM oder H₂O 1:110 verdünnt.

Als weiterer Inhibitor wurde Reopro (Abciximab, Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA) ein direkter Inhibitor des GPIIb/IIIa-Komplexes verwendet. Der Kontrollversuch dazu wurde mit IgG1-Fab-Antikörper (Ancell Corporation, Bayport, USA) durchgeführt. Die Materialien wurden wie bei dem Standardversuch auf den Coverslip pipettiert und es wurde mit der Videoaufnahme begonnen. Nach 15 Minuten wurden Reopro oder IgG1-Fab-Antikörper jeweils 10 µg/ml in die Versuchslösung hinzugefügt und die Videoaufnahme wurde für weitere 15 Minuten fortgesetzt. In der Versuchsreihe mit RGDS und RGES wurde humanes Komplement-Serum und in der Versuchsreihe mit Reopro wurde Albumin 8% und Calcium 100 mM anstelle vom Serum benutzt. Die verwendeten Inhibitoren sind in der folgenden Tabelle detailliert aufgelistet (siehe Tabelle 3).

Substanz	Nr./Firma	Konzentration	Lösungsmittel	Verdünnung
RGDS	#L7062711, US Biological	5 mg / 500 ml = 23,1 mM	H ₂ O	keine
RGES	#500848, Bachem	5 mg / 500 ml = 24 mM	H ₂ O	keine
Reopro (Abciximab)	29720D, Eli Lilly and Company	2 mg/ml	H ₂ O	keine
Mouse IgG1 Fab Monomer	#181402, Ancell	1 mg/ml	H ₂ O	keine

Tabelle 3: Substanzen für die Inhibierung des GPIIb/IIIa-Komplexes

2.4 Der Serumfaktor und dessen Wirkung auf die Thrombozytenmigration

Die Konzentrationsreihen mit dem Fibrinogen und dem Serum zeigten uns, dass die Kombination von diesen beiden Stoffen in einer bestimmten Konzentration positiv auf die Thrombozytenadhäsion und -migration wirken. Es wurde auch beobachtet, dass die Thrombozyten ohne das Serum nicht migrieren konnten. In der Folge dieser Befunde interessierte uns, welche Faktoren im Serum bei der Thrombozytenmigration eine Rolle spielen. Um diese Faktoren herauszufinden, wurden unterschiedliche Methoden benutzt.

2.4.1 Die Serumdialyse

Als erstes wurde das Serumdialyseverfahren benutzt. Humanes Komplement-Serum wurde auf einem Kit (Slide-A-Lyzer Dialyse-Kit, Thermo Scientific) pipettiert und dieses Kit wurde in einem Becherglas platziert, der mit PBS-Pufferlösung gefüllt war. Zwischen dem Kit und PBS-Pufferlösung befand sich eine Membran, welche wie eine Dialysemembran funktionierte. Durch diese Membran wurden alle Bestandteile des Serums kleiner als 2 kDa mittels Diffusion herausgenommen. Genauso konnten die Bestandteile der Pufferlösung in das Serum hineindiffundiert werden, deswegen wurde als Pufferlösung PBS verwendet, welches keine Proteine beinhaltet und möglichst neutral ist.

Während der Diffusion durch die Membran wurden Calcium und andere Serumbestandteile unter 2kDa herausgenommen. Es wurde eine Versuchsreihe mit dialysiertem Serum anstatt humanen Komplement-Serums durchgeführt. Der restliche Versuchsbau erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie beim Standardkontrollversuch. Zum Vergleichen wurden zwei Versuchsgruppen gebildet. In einer Gruppe wurde nur dialysiertes Serum und in der anderen Gruppe dialysiertes Serum mit Calcium benutzt.

2.4.2 Die Serumproteine

Durch die Serumdialyse wurde nur Calcium aus dem Serum herausgenommen, aber die Proteine blieben während dieses Prozesses intakt. Um die Rolle der Proteine auf die Migration herauszufinden, wurden Versuche mit unterschiedlichen Proteinen durchgeführt.

Als erstes wurde Albumin benutzt, weil sich in dem Standardkontrollversuch in geringer Menge humanes Albumin befand, welche für die Herstellung des Tyrodes-Puffers gebraucht wurde. Anstatt humanen Komplement-Serums wurde humanes Rekombinant-Albumin (Sig-

ma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) genommen und dazu Calcium hinzugefügt. Es wurde mit Albumin und Calcium eine Konzentrationsreihe durchgeführt, um die beste Konzentrationskombination dieser Stoffe zu finden, bei der die höchste Migrationsrate beobachtet werden kann. Für die Albumin-Konzentrationsreihe wurden Calcium 75 μ M und Albumin jeweils 8 %, 2 %, 0,5 %, 0,13 % (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) benutzt. Für die Calcium Konzentrationsreihe wurden Albumin 5 % und Calcium jeweils 20 μ M, 75 μ M, 200 μ M und 2 mM verwendet.

Nach der Auswertung der Versuche mit der Albumin- und der Calcium-Konzentrationsreihe wurden Versuche mit Ovalbumin (Albumin from chicken egg White, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) anstatt Albumin durchgeführt, um herauszufinden, ob Albumin als das einzige Protein für die Migration zuständig war oder ob andere Proteine die Thrombozytenmigration auch fördern könnten. Aber vor dem Hinzufügen des Ovalbumins sollte das Albumin, das in den Tyrodes-Puffer gemischt wurde, von dem Protokoll herausgenommen werden, sodass eine Modifikation des Protokolls der Thrombozytenpräparation vorgenommen wurde. Es wurde der für die erste Zentrifugation (PRP-Präparation) benötigte Tyrodes-Puffer ohne BSA (Albumin) hergestellt. Für die zweite Zentrifugation (WP-Präparation) wurde Tyrodes-Puffer mit Albumin 8 % und für die Pelletablösung wieder Tyrodes-Puffer ohne BSA (Albumin) genommen. In dem für die Migrationskammer benutzte Tyrodes-Puffer (pH=7,2) wurde jeweils Ovalbumin 0,1 % oder 1 % hinzugefügt und dazu wurde nach der Fibrinogengabe Ovalbumin 0,5 % und Calcium 200 μ M addiert.

Um den Effekt weiterer Proteine zu untersuchen, wurde als nächstes eine Versuchsreihe mit Casein (Casein from bovine milk, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) durchgeführt. Für diese Versuchsreihe wurden Tyrodes-Puffer wie die oben für die Ovalbumin-Versuche beschriebenen verwendet. Für die Migrationskammer wurde der Tyrodes-Puffer (pH 7,2) ohne Albumin benutzt. Es wurde Casein 0,25 % und Calcium 200 μ M dazu addiert.

Durch die Versuche mit unterschiedlichen Proteinen wurde deutlich, dass die Proteine für die Migration essenziell sind. Eine weitere Frage war, ob die Thrombozyten für die Migration komplette und intakte Proteine benötigen oder ob die Proteinanteile auch genügen. Dafür wurde Tryptocasein 0,25 % (Tryptone enzymatic digest from casein, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), das von den Enzymen verdaute Casein, verwendet. Die Versuche wurden nach dem selben Protokoll wie Versuche mit Casein durchgeführt.

Nachdem Calcium in der Versuchsreihe mit Serumdialyseverfahren als essenzieller Bestandteil der Thrombozytenmigration identifiziert wurde, wurde Versuche mit Magnesium und Mangan durchgeführt, um den Effekt anderer Ionen auf die Thrombozytenmigration herauszufinden. Diese Versuche wurden nach dem Protokoll von Albumin- und Calciumkonzentrationsreihe durchgeführt. In beiden Versuchsreihen wurde Albumin 0,5 % benutzt. Dazu wurde jeweils Magnesium 1 mM oder Magnesium 200 μ M oder Mangan 200 μ M in die Versuchslösung hinzugefügt. Zum Vergleich wurde zusätzlich Versuche mit Ionenkombinationen aus Calcium und Magnesium oder Calcium und Mangan durchgeführt. Dazu wurde Calcium 1 mM oder 200 μ M der jeweiligen Konzentration von Magnesium oder Mangan entsprechend addiert. Die in diesen Versuchen verwendeten Ionen und Proteine sind in der folgenden Tabelle im Detail beschrieben (siehe Tabelle 4).

Substanz	Nr./Firma	Konzentration	Lösungsmittel	Verdünnung
Humanes Rekombinant Albumin	A9751, Sigma-Aldrich	5 g in 100 μ l = 8 %	H ₂ O	1:4, 1:16
Ovalbumin	A5503, Sigma-Aldrich	1 g/ml = 100 %	PBS	0,05 g /10 ml = 0,5 %
Casein	C7078, Sigma-Aldrich	50 mg/ ml = 8%	H ₂ O	1:32
Tryptocasein	95039, Sigma-Aldrich	2%	H ₂ O	1:8
Calcium chloride	Sigma-Aldrich	100 mM	NaCl	1:10
Magnesium chloride				
Manganese chloride				

Tabelle 4: Proteine und Ionen

2.5 In-vitro-Analyse der Rolle von Zytoskelettelemente auf die Thrombozytenmigration

Für die Analyse der Rolle von Zytoskelettelementen auf die Thrombozytenadhäsion und -migration wurden in das Kontrollversuchsprotokoll die Inhibitoren der Zytoskelettelemente addiert. Die in den Versuchen verwendeten Inhibitoren von Zytoskelettelementen sind im Folgenden zusammengefasst (siehe Tabelle 5).

Substanz	Nr./Firma	Konzentration	Lösungsmittel	Verdünnung
(-)-Blebbistatin	#B0560, Sigma-Aldrich	10 mM	DMSO	1:10
(+)-Blebbistatin	#A203392, Calbiochem	10 mM	DMSO	1:10
Calyculin A	#9902, Cell signaling	10 µM	DMSO	1:100
Cytochalasin D	#C8273, Sigma-Aldrich	5 mg/ml = 2 mM	DMSO	1:10
Y27632 Rock-Inhibitor	#07171, Stemcell	5 mM	H ₂ O	1:5

Tabelle 5: Substanzen zur Inhibierung der Zytoskelettelemente

Die Versuche mit Blebbistatin, Calyculin A und Rock-Inhibitor wurden nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Die Standardsubstanzen (Tyrodes-Puffer, Fibrinogen, Serum, ADP und Thromboxan) wurden in den beschriebenen Konzentrationen benutzt und dazu wurden (-)- und (+)- Blebbistatin (5 µM, 50 µM) oder Calyculin A (0,5 nM, 5 nM) oder Rock-Inhibitor (50 µM, 10 µM) oder DMSO (als Kontrollversuch des jeweiligen Versuches in entsprechender Konzentration zu dem gebrauchten Substanz) addiert.

Für die Versuche mit Cytochalasin D wurden die Substanzen wie beim Standardkontrollversuch auf dem Coverslip pipettiert. Es wurde mit der Videoaufnahme begonnen. Nach 15 Minuten wurde Cytochalasin D $2\text{ }\mu\text{M}$ oder für den Kontrollversuch DMSO (1:1000) dazu addiert und die Videoaufnahme für weitere 15 Minuten fortgesetzt.

2.6 Das Differential-Interferenz-Kontrast-(DIC)-Mikroskop

Die Differential-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie ist eine moderne Technik, welche die Unterschiede in der Weglänge im betrachteten Objekt in Helligkeitsunterschiede des Bildes umwandelt. Die Versuche wurden mit einem DIC-Mikroskop (Olympus IX70 und IX83, Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

2.6.1 Aufbau und Prinzip des DIC Mikroskops

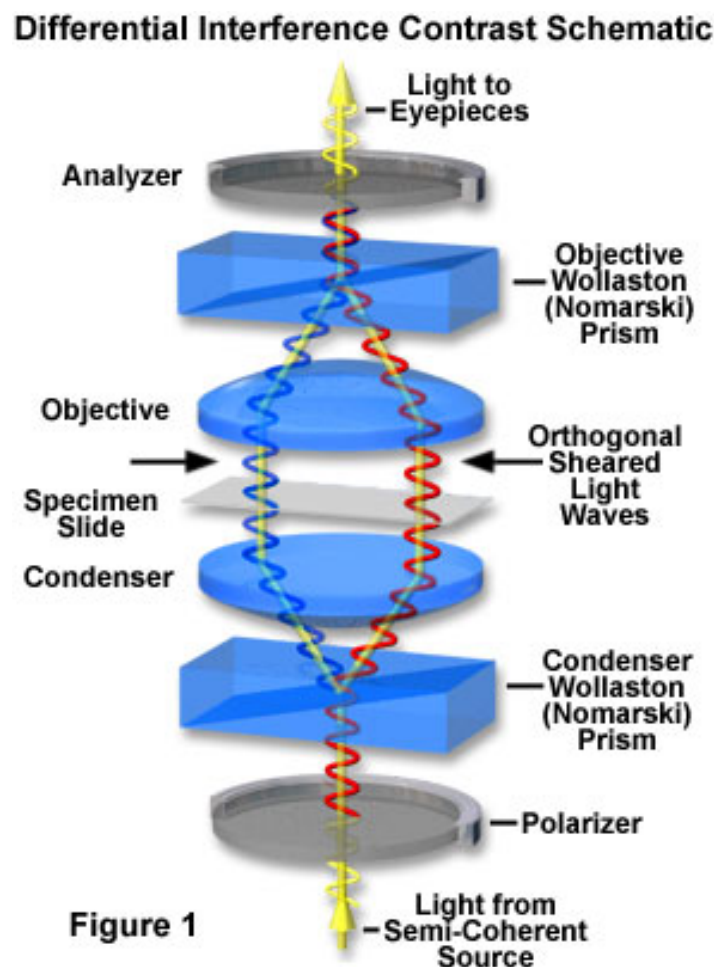


Abbildung 10: Bearbeitungsprinzip des DIC Mikroskops
(Abramowitz and Davidson, 2012)

Das DIC-Mikroskop wurde in 1950er Jahren von dem Physiker Georges Nomarski aus der Phasenkontrastmikroskopie entwickelt. Das Mikroskop ist zusammengebaut von einem Analysator, zwei Wollaston-Prismen, einem Objektiv, einem Kondensor und einem Polarisator. Der Polarisator erzeugt ein linear polarisiertes Licht. Das erste Wollaston-Prisma befindet sich vor dem Objekt und teilt einfallendes Licht in zwei senkrecht zueinander stehende Strahlen gleicher Amplitude. Die beiden Strahlen laufen parallel, aber etwas räumlich versetzt durch das Präparat. Am Präparat werden die Strahlen beide in gleicher Weise in ihrer Phase verschoben. An der Kanten der Struktur verläuft ein Strahl durch die Struktur selbst, der andere hingegen durch das Umgebungsmedium. Durch die zumeist unterschiedlichen Brechungsindices der beiden Medien kommt es zu einer Phasenverschiebung der beiden Strahlen. Nachdem die Strahlen das Objekt durchlaufen, werden sie durch das zweite Wollaston-Prisma zusammengeführt und vom Analysator zur Interferenz gebracht, wodurch sich ein deutlich kontrastiertes Bild ergibt (siehe Abbildung 10) (Abramowitz and Davidson, 2012). Durch dieses Bearbeitungsprinzip werden die Präparate reliefartig (3D) abgebildet, weil die Ränder die höchsten Dichteunterschiede aufweisen. Die Stärke der Phasenverschiebung somit des Kontrastes kann durch horizontales Verschieben des zweiten Prismas und Drehen des Polarisators geregelt werden (Volgger, 2008).

2.6.2 Mikroskop Set-Up

Die Versuchskammer wurde auf dem Tisch, der von dem Tischinkubator (Tokai HIT, INU Incubation system for Microscopes) auf 37°C erhitzt wurde, platziert. Danach wurde das Objektiv gewählt. In der Mehrzahl der Versuche wurde das 40 × /1.0 Öl-Immersions-Objektiv benutzt. Das Objektiv wurde auch von einem Objektivverhitzer (Bioptechs Objective Controller) auf 37 °C erhitzt. Nachdem die Objektiv- und Tischeinstellungen optimiert wurden, wurde mit dem der CCD-Kamera (XM10, Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland) mit der Videoaufnahme begonnen.

2.6.3 Software

Die Versuchsvideos wurden mit der Software Cellsens Dimension aufgenommen. Nach der Optimierung der Lichteinstellungen für die CCD-Kamera wurde mit der Videoaufnahme begonnen. Es wurde automatisch alle 12 Sekunden ein Bild gespeichert. Die Videos wurden für 30 Minuten laufengelassen. Danach wurde das entstandene Video in seiner zeitlichen Auflö-

sung 1:10 komprimiert und somit in ein Video mit einem Bild alle 2 Minuten umgewandelt. Das neue, komprimierte Video wurde für die Auswertung erneut gespeichert.

2.7 Quantifizierung der Daten

Die Versuche wurden mit dem Programm ImageJ (Image Processing and Analysing in Java) ausgewertet. Dieses Programm wurde von Wayne Rasband am U.S National Institutes of Health entwickelt (Burger and Burge, 2006).

2.7.1 ImageJ – Einstellung des Programms

ImageJ ist ein frei verfügbares Programm. Für die Auswertung der Versuche wurden verschiedene Plug-Ins benutzt. Dazu gehören die Plug-Ins Image Stabilizer, Manual Tracking und Chemotaxis Tool. Die Bearbeitung der Videos wurde in drei Abschnitte unterteilt: Die Stabilisierung der Videos mit Auswählen eines Fensters, das Tracken der Thrombozyten und die Berechnung der Werte mittels Chemotaxis Tool.

Vorbereitung der Videos

Als Erstes wurden die Videos mit Image Stabilizer Tool stabilisiert. Weil die Videos mit unterschiedlichen Objektivgrößen aufgenommen wurden, wurden vor der Bearbeitung jeweils einen Ausschnitt der Videos herausgenommen. Diese Ausschnitte wurden je nach der Objektivgröße gewählt, damit die für die Auswertung genommenen Oberflächen und dadurch die mittlere Thrombozytenzahl übereinstimmten. Die Auswahl der Ausschnitts-, und Pixelgröße sowie der Position des Fensters werden im Folgenden beschrieben (siehe Tabelle 6). Die ausgewählten Videoabschnitte wurden für die weitere Bearbeitung neu gespeichert.

Objektivgröße	Pixelgröße	Ausschnittgröße	Position
40×	0,1622 $\mu\text{m}/\text{px}$	625*469	375*289
60×	0,1075 $\mu\text{m}/\text{px}$	942*710	217*164

Tabelle 6: Auswahl der Videogrößen

2.7.2 ImageJ – Tracken der Thrombozyten

Für die Bestimmung der Migrationslänge und -geschwindigkeit sowie des Anteils der migrierenden Thrombozyten an der Adhärenzen wurden die Thrombozyten mittels des Plug-Ins Manuel Tracking verfolgt. Für das Tracken wurden die folgenden Kriterien aufgestellt: Sobald ein Thrombozyt adhärent war, wenn also eine Lamelle und einen Pseudonucleus erkennbar waren, wurde mit dem Tracken begonnen. Die Thrombozyten wurden solange verfolgt, bis sie aus dem Bild verschwanden, mit der Lamelle auf eine andere Zelle trafen oder deadhärent waren. Nach dem Tracken aller allein migrierenden Thrombozyten wurde das Video mit Overlay Dots&Lines (verfolgten Spuren) als ein neues Video abgespeichert. Die Ergebnisse wurden als Excel-Dokument gespeichert. Danach wurden die Ergebnisse in Chemotaxis Tool erneut geöffnet. Nach der Angabe von Pixelgröße und Diaanzahl des Videos wurden statistische Merkmale wie die Geschwindigkeit, die Distanz und die Richtungsabhängigkeit automatisch von dem Programm berechnet. Diese Daten wurden getrennt als Excel-Dokumente gespeichert.

Für die Bestimmung des Anteils der migrierenden Thrombozyten an den Adhärenzen wurde die Anzahl der adhärenzen Thrombozyten bestimmt. Dafür wurde zuerst das bearbeitete und abgespeicherte Video geöffnet und die restlichen Thrombozyten wurden durch einmaliges Anklicken erkannt. Die Addition der Anzahl von migrierenden Thrombozyten mit restlichen Thrombozyten ergab die Gesamtzellzahl. Außerdem wurde auch die Anzahl der Thrombozyten bestimmt, die in Gruppen migrierten. Dazu wurden die Anzahl nicht migrierender Thrombozyten aus dem Gesamtzellzahl subtrahiert.

2.7.3 Auswertung der Ergebnisse – Excel

Die mittels Chemotaxis Tool berechneten Ergebnisse für die Versuche mit gleicher Substanz gleicher Konzentration wurden in einem Excel-Dokument gespeichert, dadurch wurden die getrennt gespeicherten Ergebnisse zusammengeführt. Für alle Versuche wurden jeweils die mittlere Geschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$, der mittlere akkumulierte Abstand in μm , der mittlere euklidische Abstand in μm , der kürzeste Abstand zwischen zwei Punkten im n-dimensionalen Raum sowie deren Standardabweichung berechnet. Der Mittelwert aller Werte je eines Parameters wurde als arithmetisches Mittel berechnet. Für die Berechnung der Standardabweichung wurde die folgende Formel benutzt.

$$\text{Sample Standard Deviation} = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

Danach wurden die Mittelwerte dieser Parameter in eine neue Tabelle übertragen, dadurch entstand je eine Zusammenfassung einer Versuchsreihe. Mit einer erneuten Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung dieser Werte wurde die mittlere Geschwindigkeit in $\mu\text{m}/\text{min}$, mittlerer akkumulierter sowie mittlerer euklidischer Abstand in μm in einer Versuchsreihe bestimmt. Diese Werte wurden auf der Thrombozytenzahl basierend (cell based) und auf der Anzahl der Schritte basierend (step based) ermittelt. Für die step-based-Werte wurden die Anzahl der Schritte migrierender Thrombozyten, die von dem Programm automatisch gezählt wurde, genommen. Für die Berechnung von Thrombozytenzahl basierende (cell based) Geschwindigkeit wurde die mittlere Tracklänge durch die Observierungszeit geteilt. Bei der schrittbasierenden Geschwindigkeit (step based) wurde die mittlere Distanz, die ein Plättchen zwischen zwei Bildern zurücklegt, durch die Framerate der Aufnahme geteilt.

In einer weiteren Tabelle wurden die Anzahl der alleine migrierenden Thrombozyten, der nicht migrierenden Thrombozyten und die Gesamtzellzahl eingetragen und die Mittelwerte und die Standardabweichungen dieser Gruppen für jeweilige Versuchsreihen ermittelt.

Für den Vergleich unterschiedlicher Konzentrationen einer Substanz wurden die mittleren Geschwindigkeiten in $\mu\text{m}/\text{min}$ step based und cell based sowie die mittleren akkumulierten Abständen in μm und die mittleren Abstände pro Schritt in μm zusammen mit Standardabweichungen in eine neue Excel-Tabelle getragen. Durch das Erstellen eines Säulendiagramms für den jeweiligen Parameter wurden die Ergebnisse graphisch dargestellt. Für die Beurteilung des Anteils der migrierenden Thrombozyten an den Adhärenten (Gesamtzellzahl) wurden eine Tabelle und ein Säulendiagramm mit Zellzahlen oder deren prozentualem Anteil an der Gesamtgruppe angegeben.

2.7.4 Statistische Überprüfung der Ergebnisse – SPSS

Die statistische Überprüfung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm SPSS (IBM Corporation, SPSS Statistics, Version 25.0). Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte mit Kolmogorov-Smirnov-Test. Während dieser Überprüfung wurde eine Datenanalyse gemacht und die Daten als Histogramm und Verteilungsdiagramm abgebildet. Wenn der Signifikanz-

wert des Kolmogorov-Smirnov-Tests $< 0,05$ ist, werden die Daten als nicht normalverteilt kategorisiert. Im Gegensatz dazu werden die Daten als normalverteilt kategorisiert, wenn der Signifikanzwert des Tests $> 0,05$ ist. Wenn das Ergebnis von Kolmogorov-Smirnov-Test nicht bestimmt werden konnte, wurde für die Überprüfung auf Normalverteilung Shapiro-Wilk-Test benutzt. Die Interpretation der Ergebnisse von diesem Testverfahren erfolgte analog zu der des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Gleichzeitig wurden das Histogramm und die Q-Q-Diagramme angeschaut, welche die Verteilung der Daten graphisch darstellten. Wenn die Daten im Histogramm ein glockenförmiges Aussehen hatten oder im Q-Q-Diagramm auf einer Linie lagen, waren sie normalverteilt. Wenn die Daten außerhalb der Idealkurve vom Histogramm oder des Q-Q-Plots lagen, wurden sie als nicht normalverteilt bewertet.

Nach der Überprüfung auf Normalverteilung, erfolgte die Bestimmung des Signifikanzwerts für die jeweiligen Versuchsreihen. Wenn die Daten normalverteilt waren, wurde für den Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen der T-Test und von mehr als zwei unabhängigen Gruppen die einfaktorielle Varianzanalyse benutzt. Für die nicht normalverteilten Daten wurde zum Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen der Mann-Whitney-U-Test und von mehr als zwei unabhängigen Gruppen der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die normalverteilten und abhängigen Gruppen wie Cytochalasin D und Reopro wurden mit einem gepaarten T-Test statistisch analysiert.

Die Überprüfung auf Varianzenhomogenität erfolgte mit dem Levene-Test. Wenn der Signifikanzwert vom Levene-Test $> 0,05$ ist, dann sind die Varianzen gleich und wenn er $< 0,05$ liegt, dann sind sie nicht gleich. Es wurde automatisch für beide Aussagen p-Werte ermittelt und nachdem Ergebnis des Levene-Tests wird der entsprechende p-Wert als Endergebnis genommen. Wenn der p-Wert des statistischen Tests $< 0,05$ liegt, dann werden die Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen als signifikant bewertet und die Nullhypothese, welche aussagt, dass die Merkmale von den Gruppen gleich sind, kann mit $> 95\%$ Wahrscheinlichkeit abgelehnt werden. Wenn der p-Wert $> 0,05$ ist, werden die Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen als nicht signifikant bewertet, sodass die Nullhypothese beibehalten wird.

3 Ergebnisse

3.1 Blockierung der GPIIb/IIIa-Fibrinogen-Verbindung inhibiert die Thrombozytenmigration

3.1.1 RGD-Peptide inhibieren die Thrombozytenadhäsion und -migration

Aus vorausgehenden Arbeiten ist es bekannt, dass die RGD-Peptide die Verbindung zwischen GPIIb/IIIa-Integrin und deren Ligand Fibrinogen blockieren (Peerschke and Galanakis, 1987). RGD-Sequenzen der Fibrinogen bindenden Domäne erhöhen die Affinität der Verbindung von Fibrinogen an aktivierten Plättchen (Mohri and Ohkubo, 1993). In dieser Arbeit haben wir die Wirkung der RGD-Domäne auf die Thrombozytenmigration untersucht. Dafür haben wir die aus Humanblut isolierten Thrombozyten mit RGD-Peptiden gemischt und mittels Thromboxan und ADP aktiviert. Es wurde dabei beobachtet, dass die Anzahl der adhären-ten sowie der migrierenden Thrombozyten bei den Kontrollversuchen mit H₂O am höchsten ist und in Anwesenheit von RGD-Peptiden signifikant abnimmt. Bei den Versuchen mit H₂O werden im Mittel 16 Thrombozyten pro Gesichtsfeld adhärent und 87,5 % davon migrieren. Bei den Versuchen mit RGDS 200 µM erniedrigt sich die Anzahl der adhären-ten Thrombozyten im Mittel auf 5 pro Gesichtsfeld und nur noch 40 % davon können migrieren. Ebenso wird ein Abfall der Migrationsgeschwindigkeit und dementsprechend der zurückgelegten Distanz festgestellt. Die mittlere Geschwindigkeit der Thrombozyten halbiert sich bei den Versuchen mit RGDS (0,52 µm/min) im Vergleich zum Kontrollversuch mit H₂O (1,04 µm/min). Die Kontrollversuche mit RGEs zeigen ungefähr gleiche Ergebnisse wie die Kontrollversuche mit H₂O, wenn die Migrationsgeschwindigkeit und die Distanz verglichen werden. Mittlere Geschwindigkeit der Thrombozyten beträgt bei der Versuchsreihe mit RGEs im Vergleich zur H₂O 1,06 µm/min und 1,04 µm/min. Die mittlere hinterlegte Distanz nach 30 Minuten ist bei der Versuchsreihe mit RGEs 2,11 µm und bei der mit H₂O 2,08 µm. Die Anzahl der adhären-ten Thrombozyten ist bei Versuchen mit RGEs weniger im Vergleich zum Kontrollversuch mit H₂O, aber der Anteil der alleine migrierenden Thrombozyten beträgt in beiden Gruppen circa 67–68 % (siehe Abbildung 11).

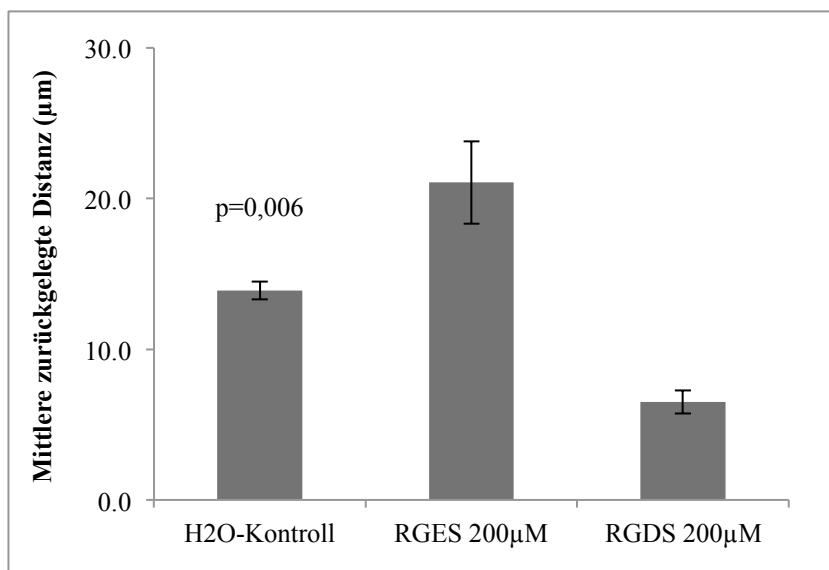
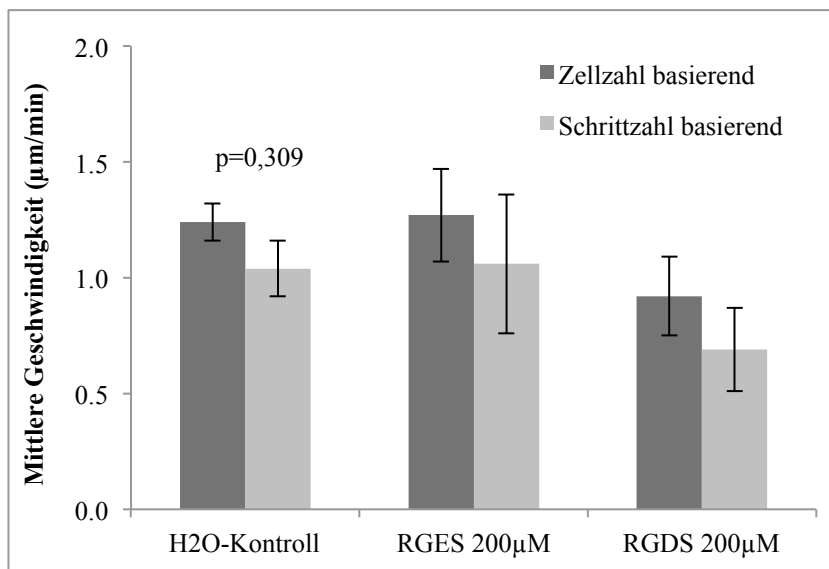
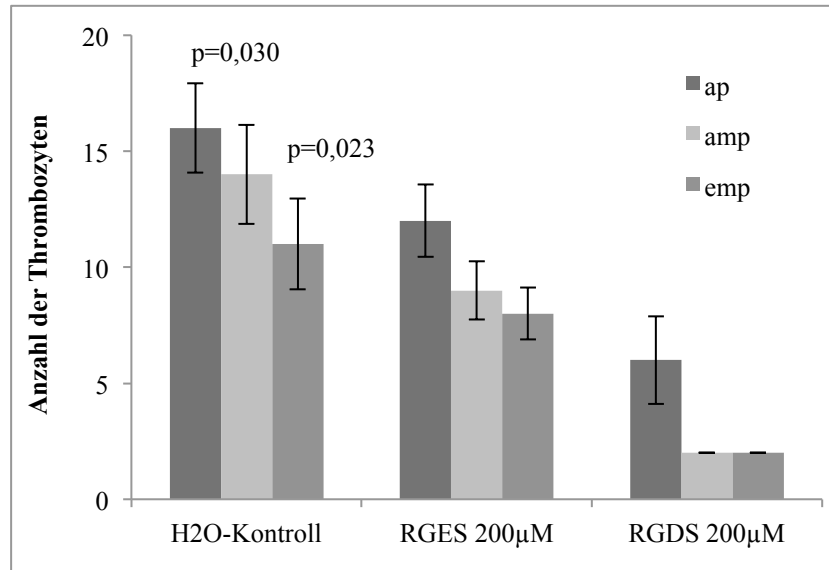


Abbildung 11: Darstellung des Einflusses von RGD-Peptiden auf die Thrombozytenmigration.

Anzahl der adhärenenten und migrierenden Thrombozyten bei den Versuchen mit H₂O, RGEs und RGDS (oben). Die Migrationsgeschwindigkeit der Thrombozyten (Mitte). Die zurückgelegte Distanz der Thrombozyten (unten). Unter Verwendung von RGDS nimmt die Anzahl der adhärenenten und migrierenden Thrombozyten ($p=0,030$, $p=0,023$) sowie die zurückgelegte Distanz ($p=0,006$) signifikant ab, während die Unterschiede in der Geschwindigkeit sich statistisch als nicht signifikant präsentieren ($p=0,309$), ($n=4$, einfaktorielle Varianzanalyse). Diese Ergebnisse wurden in abgeänderter Form (Abbildung 3B und 3C) im Paper (Gaertner et al., 2017) publiziert.

Für die Migration sollen die Thrombozyten zuerst adhärenent werden und sich mittels Integrin-Ligand-Komplexe an die Oberfläche verbinden. Erst dann können sie sich durch die Reorganisation der Zelle und durch die Adhäsions- und Retraktionskräfte fortbewegen. Aus diesem Ergebnis lässt sich schlussfolgern, dass die Verbindung zwischen Fibrinogen und RGD-Domäne des $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrins die Adhäsionsstärke und -häufigkeit und dadurch die Migrationsgeschwindigkeit reguliert.

3.1.2 GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist inhibiert die Thrombozytenmigration

Die wichtige Rolle der Interaktion zwischen Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor und Fibrinogen bei der Bildung eines Thrombozytenaggregats mittels Aktivierung der Thrombozyten wurde durch verschiedene Versuche in diesem Bereich nachgewiesen (Marguerie et al., 1979).

Der Antikörper Abciximab, ein Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist, verhindert die Bindung von Fibrinogen an GPIIb/IIIa und dadurch die Aktivierung der Thrombozyten. Er wird häufig während und nach Koronarangioplastien benutzt, um eine Thrombusformation durch die Thrombozytenaggregation zu verhindern (Tcheng et al., 2003). In dieser Arbeit haben wir die Wirkung der Antagonisierung vom Glykoprotein-IIb/IIIa mittels Abciximab (Reopro) auf die Thrombozytenmigration untersucht. Im Rahmen dieses Experiments wurden die aus Humanblut isolierten Thrombozyten zuerst durch die Thrombozytenaktivatoren aktiviert. Dabei wurde die Thrombozytenmigration mit einem DIC-Mikroskop aufgenommen. Nach 15 Minuten wird der Antikörper Abciximab oder IgG-Fab als Kontrollversuch in die Versuchslösung addiert und die Videoaufnahme für 15 Minuten fortgeführt. Direkt nach der Addition von Abciximab kommt es zu einer abrupten Unterbrechung der Migration. Nach Gabe von Abciximab können sich weitere Thrombozyten adhärenieren, aber eine Migration kann nicht mehr beobachtet werden. Im Vergleich dazu findet in dem Kontrollversuch nach Addition von IgG-Fab die Migration weiterhin unverändert statt (siehe Abbildung 12).

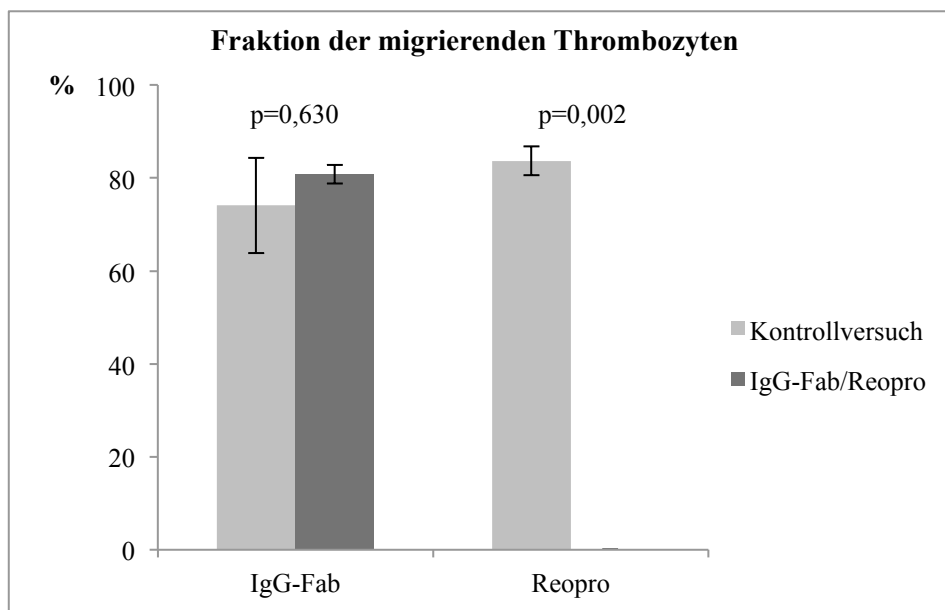


Abbildung 12: Thrombozytenmigration nach Blockierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors.

Der Anteil von migrierenden Thrombozyten an Adhärenenten bei den Versuchsreihen mit Abciximab (Reopro) und IgG-Fab. In den Versuchen mit IgG-Fab kann kein signifikanter Unterschied zwischen vor und nach der Gabe beobachtet werden ($p=0,630$), wohingegen in den Versuchen mit Abciximab ein signifikanter Unterschied zwischen vor und nach der Gabe besteht ($p=0,002$). ($n=3$, gepaarter T-Test)

Für die Migration der Thrombozyten ist ihre Aktivierung durch die Integrin-Ligand-Bindung zwischen Glykoprotein IIb/IIIa und Fibrinogen essenziell.

3.2 Inhibierung von Myosin verhindert die Migration und verursacht morphologische Veränderungen

Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass die Zytoskelettelemente bei verschiedenen Zellarten bei dem Migrationsprozess eine essenzielle Rolle spielen. Für die Fortbewegung der Zellen reorganisieren sich die Zytoskelettelemente nachdem sie durch Signalkaskaden aktiviert werden. In früheren Studien wurde die Reorganisation der Zytoskelettelemente mittels Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen (Barnhart et al., 2011, Wilson et al., 2010). Die Reorganisation der Zytoskelettelemente dient dazu, dass die Zellen ein Lamellipodium, eine ellipsoide Form, bilden und dass die Adhäsions- und Retraktionskräfte in einem Gleichgewicht bleiben, sodass die Zellkontinuität während der Migration beibehalten werden kann. Dies kann durch die Bildung einer Zellkontraktionsmaschine mittels der Verbindung zwischen Myosin- und Aktinfilamenten erreicht werden. Diese Verbindung kann die Kräfte von einer Zellseite

auf die andere Zellseite übertragen. Dadurch werden starke Kräfte wie Adhäsions-, Migrations- und Retraktionskräfte regelmäßig verteilt.

3.2.1 Der direkte Myosin II-Inhibitor vermindert die Migrationsrate und -geschwindigkeit

Um die Wirkung von Inhibierung der Myosinaktivität auf die Thrombozytenmigration rauszufinden, haben wir Versuche mit Blebbistatin, einem direkten Inhibitor von Myosin II, durchgeführt. In dieser Versuchsreihe wurde in die Versuchslösung mit aus Humanblut isolierten und in-vitro aktivierten Thrombozyten Blebbistatin unterschiedlicher Konzentrationen hinzugefügt. Es wurde beobachtet, dass die Thrombozyten unter Wirkung von Blebbistatin weiterhin an der Oberfläche anheften können. Die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten liegt in den vier Versuchsgruppen zwischen 125 und 140 pro Gesichtsfeld und zeigt keinen nennenswerten Unterschied. Im Gegensatz dazu wurde ein signifikanter Abfall der Anzahl der migrierenden Thrombozyten beobachtet. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass die migrierenden Thrombozyten langsamer werden und dementsprechend die von Ihnen zurückgelegte Distanz abnimmt. In dem Kontrollversuch mit DMSO liegt der Anteil an alleine migrierenden Thrombozyten bei 71 % und in dem mit Kontroll-(+)-Blebbistatin bei 45 %. In dem Versuch mit (-)-Blebbistatin 5 μM können 24 % und in dem mit (-)-Blebbistatin 50 μM nur noch 13 % der Thrombozyten alleine migrieren. Die Geschwindigkeit der Thrombozyten fällt in der Gruppe mit (-)-Blebbistatin 5 μM im Vergleich zur Kontrollgruppe mit DMSO um mehr als die Hälfte ab. Sie beträgt in der Gruppe mit DMSO 1,01 $\mu\text{m}/\text{min}$ (cell based) und 0,81 $\mu\text{m}/\text{min}$ (step based); in der mit (-)-Blebbistatin 5 μM 0,43 $\mu\text{m}/\text{min}$ (cell based) und 0,33 $\mu\text{m}/\text{min}$ (step based). Mit der Zunahme der Blebbistatinkonzentration verstärkt sich der Effekt der Myosininhibierung, was sich in einer weiteren Verminderung der Geschwindigkeit auf 0,31 $\mu\text{m}/\text{min}$ (cell based) und 0,25 $\mu\text{m}/\text{min}$ (step based) sowie der zurückgelegten Distanz zeigt (siehe Abbildung 13).

In den Videoaufnahmen mit DIC-Mikroskop kann beobachtet werden, dass unter Blebbistatinwirkung viele Thrombozyten danach streben, in eine Richtung zu migrieren, und dementsprechend Lamellipodien bilden. Weil die Retraktion an der Hinterkante der Thrombozyten durch die Inhibierung von Myosin II verhindert wird, bleiben sie an der Oberfläche fest anheftend, was zu deutlich sichtbaren Formveränderungen des Zytoplasmas führt. Viele Thrombozyten bilden eine längliche, dreieckige oder runde Form. Manche Thrombozyten bilden kleine spitze Verlängerungen (spikes) des Zytoplasmas in verschiedenen Richtungen (siehe Abbildung 14).

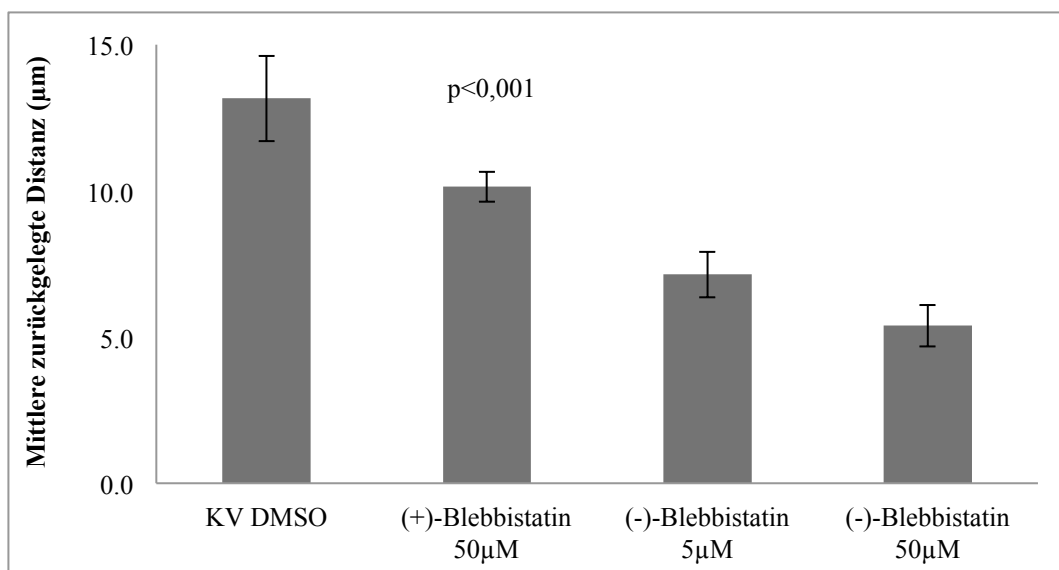
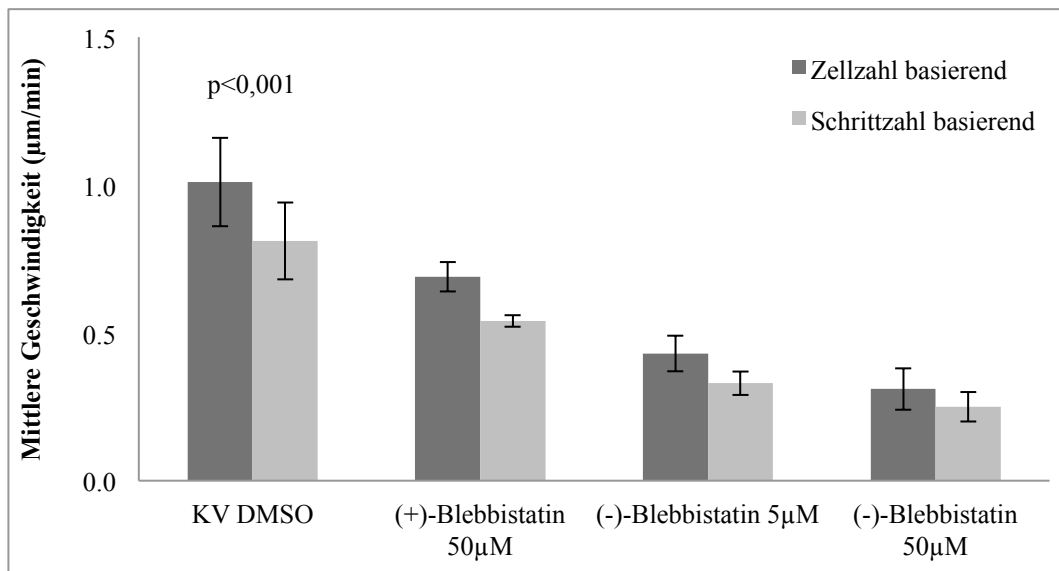
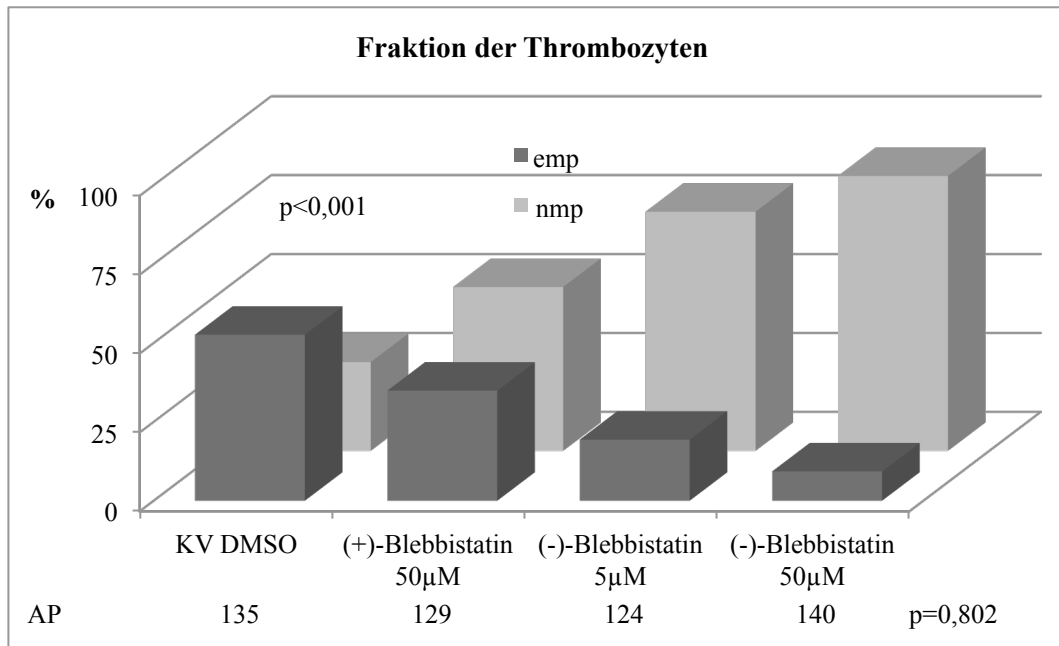


Abbildung 13: Blebbistatinwirkung auf die Thrombozytenmigration.

Der Anteil an migrierenden Thrombozyten fällt bei Versuchen mit Blebbistatin konzentrationsabhängig signifikant ab ($p < 0,001$, einfaktorielle Varianzanalyse, oben), während die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten (AP) keinen signifikanten Unterschied zeigt ($p = 0,802$, einfaktorielle Varianzanalyse, oben). Geschwindigkeit der Thrombozyten nimmt unter Blebbistatinwirkung signifikant ab ($p < 0,001$, Kruskal-Wallis-Test, Mitte). Die zurückgelegte Distanz wird dementsprechend auch signifikant geringer ($p < 0,001$, Kruskal-Wallis-Test, unten). ($n = 5$)

10 μm

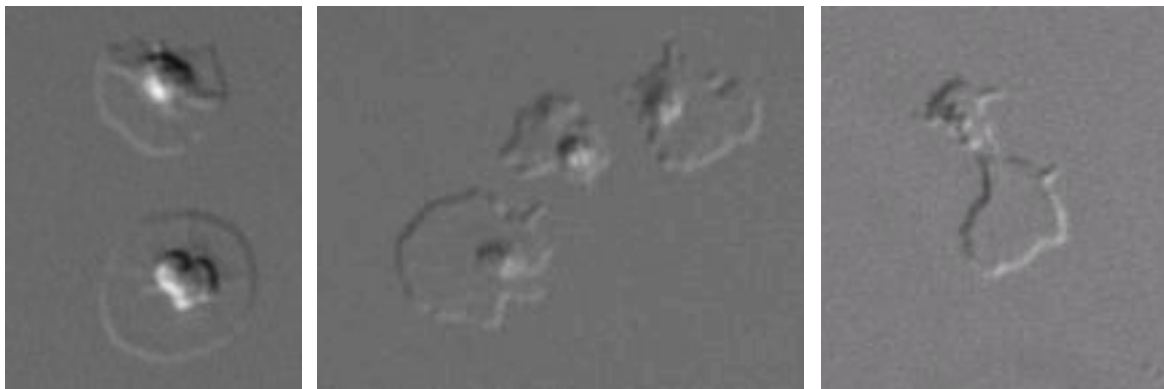


Abbildung 14: Formveränderungen der Thrombozyten unter Blebbistatinwirkung.

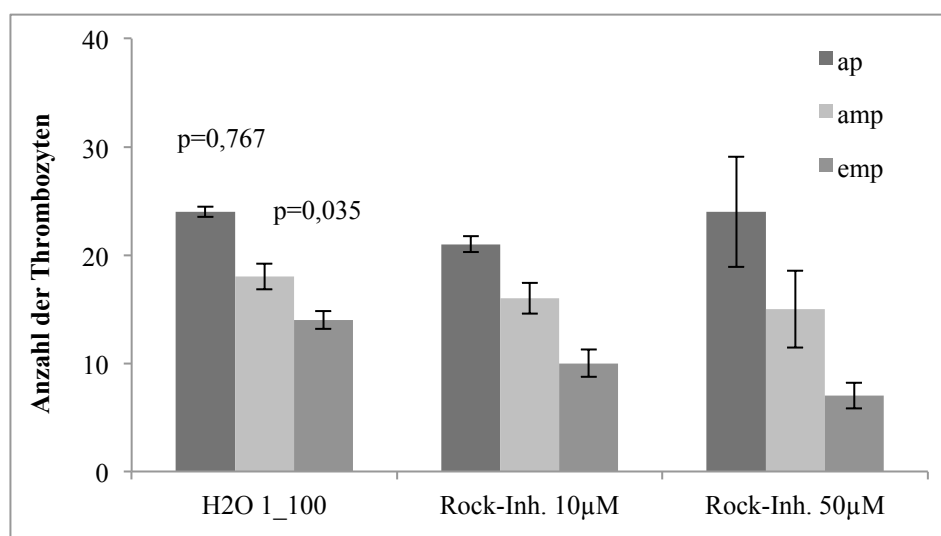
Thrombozyten zeigen sich nach Inhibierung von Myosin II mit Blebbistatin rund (links), länglich verzogen (rechts), halbmondförmig sowie dreieckig (Mitte) mit kleinen spitzen Verlängerungen (spikes). Weitere Bildabschnitte mit morphologisch veränderten Thrombozyten aus dieser Untersuchungsreihe wurden (Abbildung 4E und 4G) im Paper (Gaertner et al., 2017) veröffentlicht.

3.2.2 Die Myosininhibierung über Rho-Rock-Kaskade verursacht morphologische Veränderungen

In der Versuchsreihe mit Blebbistatin konnte festgestellt werden, dass die Inhibierung der Myosin II zur erheblichen Störung der Retraktion an der Zellhinterkante führt, welche die Migration verlangsamt oder sogar zum Teil komplett hemmt. Nachdem wir die entscheidende Rolle der Myosinaktivierung in der Thrombozytenmigration gesehen haben, wollten wir genauer untersuchen, über welchen Signalweg zu einer Myosinaktivierung kommt. Dafür haben wir eine Versuchsreihe mit ROCK-Inhibitor durchgeführt, welche die Aktivierung von Myosin II über Rho-Rock-Kaskade hemmt. In dieser Versuchsreihe wurden die aus dem Humanblut isolierten und in-vitro aktivierten Thrombozyten mit ROCK-Inhibitoren gemischt. In den Videoaufnahmen kann beobachtet werden, dass die mit ROCK-Inhibitor gemischten Thrombozyten an der Oberfläche adhären können. Am Anfang fangen die Thrombozyten zu migrieren an, aber nach einer kurzen Zeit von circa 10 bis 15 Minuten werden die Thrombozyten langsamer und manche migrieren nicht weiter. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der

ROCK-Inhibitor die Myosinaktivierung über die Rho-Rock-Kaskade verhindert, aber Myosin weiterhin von anderen Enzymen aktiviert werden kann. Die Rho-Rock-Kaskade aktiviert die Phosphorylierung von MLC und inhibiert die MLC Phosphatase, welche zusammen zur vermehrten Phosphorylierung und verminderte Dephosphorylierung von MLC führt. Die phosphorylierte MLC wird aktiv und kann die Aktivität von Myosin II, somit die Verknüpfung zwischen Aktin und Myosin steigern. Nach Inhibierung der Rho-Rock-Kaskade, kann die MLC weiterhin von MLCK phosphoryliert und damit aktiviert werden. Dadurch findet am Beginn der Versuche die Migration ohne große Veränderungen statt, aber nach einer gewissen Zeit wird der Effekt vom ROCK-Inhibitor sichtbar.

Die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten ist in drei Versuchsgruppen nahezu identisch und beträgt zwischen 21 und 24 pro Gesichtsfeld. Der Anteil an migrierenden Thrombozyten liegt zwischen 63 % und 75 % und zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Versuchsgruppe mit ROCK-Inhibitor 10 μ M. Im Gegensatz dazu nimmt der Anteil an migrierenden Thrombozyten in der Versuchsgruppe mit ROCK-Inhibitor 50 μ M im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich ab. Der Anteil an alleine migrierenden Thrombozyten beträgt in der Kontrollgruppe 58 % und in der Versuchsgruppe mit ROCK-Inhibitor 50 μ M 29 %. Die mittlere Geschwindigkeit nimmt in der Versuchsgruppe mit Rock-Inhibitor 50 μ M im Vergleich zum Rock-Inhibitor 10 μ M ab. Die mittlere zurückgelegte Distanz nimmt entsprechend der Geschwindigkeit und der Anzahl der migrierenden Thrombozyten in den Versuchsgruppen mit ROCK-Inhibitor im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Sie liegt in der Kontrollgruppe bei 12,55 μ m, in der Gruppe mit ROCK-Inhibitor 10 μ M bei 11 μ m und in der Gruppe mit ROCK-Inhibitor 50 μ M bei 9 μ m (siehe Abbildung 15).



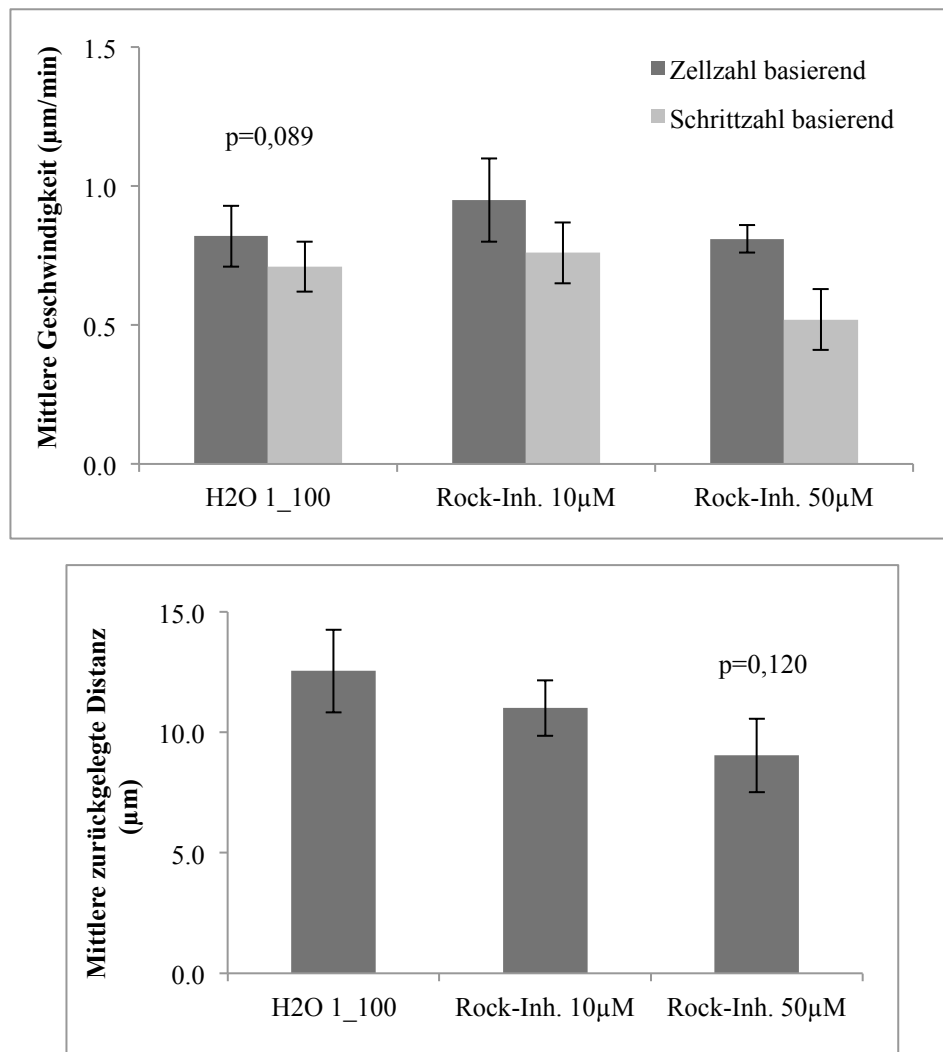


Abbildung 15: Wirkung der Inhibition von Myosin über die Rho-Rock-Kaskade auf das Migrationsverhalten der Thrombozyten.

Die Anzahl der adhärenen Thrombozyten zeigt keinen signifikanten Unterschied ($p=0,767$, einfaktorielle Varianzanalyse), aber die Anzahl der migrierenden Thrombozyten nimmt unter Wirkung von Rock-Inhibitor signifikant ab ($p=0,035$, einfaktorielle Varianzanalyse) (oben). Die mittlere Geschwindigkeit in drei Versuchsgruppen zeigt keinen signifikanten Unterschied ($p=0,089$, Kruskal-Wallis-Test, Mitte). Die mittlere Distanz nimmt unter Wirkung von Rock-Inhibitor tendenziell ab ohne statistische Signifikanz ($p=0,120$, Kruskal-Wallis-Test, unten). ($n=3$)

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen sich in der Gruppe mit ROCK-Inhibitoren morphologische Veränderungen. Es entstehen Fenestrationsen, kleine Lücken, im Zytoplasma oder die Thrombozyten bilden anstatt Lamellipodien eine längliche schmale Form. Die Fenestrationsen entstehen durch die Zerstörung der Zellkontraktionsmaschine, welche die Retraktionskräfte überträgt. Weil die Übertragung der Retraktionskraft durchgebrochen wird, wird die vordere Seite des Thrombozyts polarisiert und beginnt mit der Migration, wohingegen die hintere Seite an der Oberfläche anheftend bleibt. Die hintere Seite kann sich bei fehlender Übertragung der Retraktionskraft in die polarisierte Richtung nicht fortbewegen und dadurch entstehen die

Fenestrations am Zytoplasma. Die Entstehung einer schmalen länglichen Form anstatt einer fächerförmigen (fan-shaped) kann auch mit diesem Funktionsausfall erklärt werden. Der Verlust des Thrombozyts an von Myosin abhängiger Viskoelastizität endet mit einer Zelldeformation (siehe Abbildung 16).

10 μm

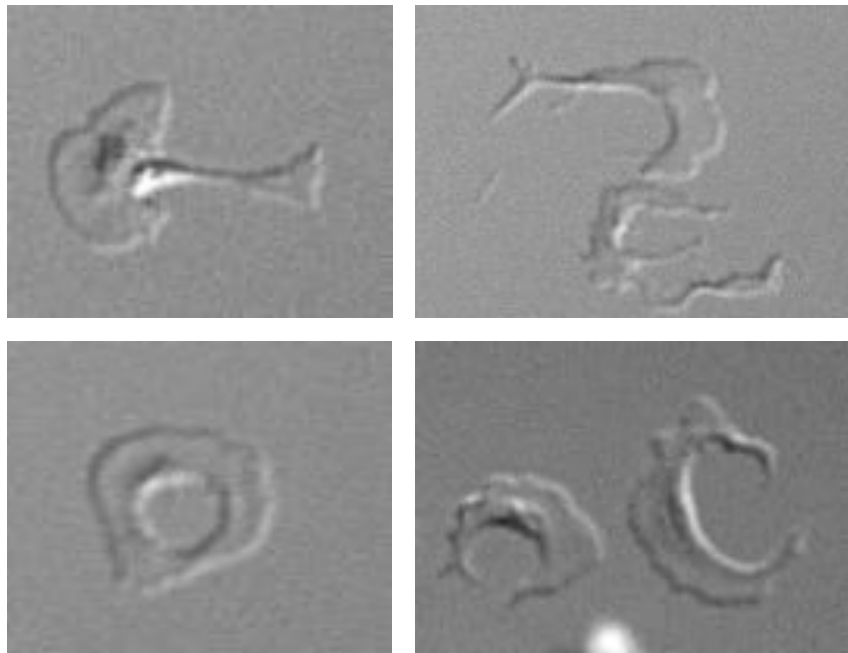


Abbildung 16: Zytoplasmatische Formveränderungen der Thrombozyten unter Myosininaktivierung mittels Rock-Inhibitoren.

Thrombozyt mit schmaler Verlängerung des Zytoplasmas nach hinten gleich einem Schwanz (links oben), deformierte Thrombozyten mit multiplen Fenestrations (rechts oben), ein Thrombozyt mit einer zentralen Fenestration (links unten) und zwei mondsichelförmige Thrombozyten (rechts unten).

3.3 Cytochalasin D, Inhibitor der Aktinpolymerisation, verhindert die Migration

Eine weitere wichtige Komponente der Reorganisation von Zytoskelettelementen ist die Aktinpolymerisation.

Cytochalasine sind eine Gruppe von vor allem aus Schimmelpilzen isolierten zytostatisch wirksamen Stoffwechselprodukten (Toxinen). Cytochalasin D ist ein wirksameres Derivat von Pilzalkaloid, Cytochalasin B, und bindet an das Plusende von F-Aktin. Dadurch verhindert es dort die weitere Anlage von Monomeren und die Aktinpolymerisation. Aufgrund der

höheren kritischen Konzentration von G-Aktin-Monomeren für das freie Minus-Ende kommt es zur Depolymerisation des Aktinfilaments. (Harvey Lodish, 1996)

Aus früheren Studien ist es bekannt, dass andere Zellen wie Fishkeratozyten die Aktinpolymerisation an der Zellvorderkante für die Migration benötigen (Barnhart et al., 2011). Um die Rolle der Aktinpolymerisation an der Thrombozytenmigration herauszufinden, wurde eine Versuchsreihe mit Cytochalasin D durchgeführt. Dabei wurden die aus Humanblut isolierten Thrombozyten aktiviert und für circa 15 Minuten unter dem Mikroskop beobachtet, wo sie adhärten und migrierten. Danach wurde Cytochalasin D zu der Versuchslösung addiert. Unmittelbar nach der Addition von Cytochalasin D wurden ein schlagartiger Abbruch der Migration und gleichzeitig morphologische Veränderungen der Thrombozyten beobachtet. Die ellipsoide Form der Thrombozyten wandelte sich in eine rundliche Form mit spitzen Ausläufern um (siehe Abbildung 18). Die Thrombozyten in der Kontrollgruppe nach Addition von DMSO konnten ohne jegliche morphologische Veränderung mit fast gleichgebliebener Geschwindigkeit weiter migrieren. Die mittlere Geschwindigkeit vor und nach DMSO-Gabe beträgt jeweils 4,81 und 4,59 $\mu\text{m}/\text{min}$, wobei die Geschwindigkeit nach Cytochalasin D-Gabe bei 0 $\mu\text{m}/\text{min}$ liegt (siehe Abbildung 17).

Nach der Zugabe von DMSO konnten weitere Thrombozyten an der Oberfläche adhärten, nach der Zugabe von Cytochalasin D hingegen blieb die Anzahl von adhären Thrombozyten gleich (siehe Abbildung 17). Die in der Versuchslösung frei zirkulierenden Thrombozyten können nach der Inhibierung der Aktinpolymerisation sich nicht mehr an der Oberfläche anheften. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass die Affinität von $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin für Fibrinogen durch die Aktinfilamente reguliert wird (Peerschke, 1984, Fox et al., 1996). Aufgrund der Inaktivierung und des Abbruchs der Verlängerung der Aktinfilamente findet kein Inside-out-signaling mehr statt und die Affinität von $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin für Fibrinogen nimmt ab, was sich durch die Verminderung der Adhäsion zeigte.

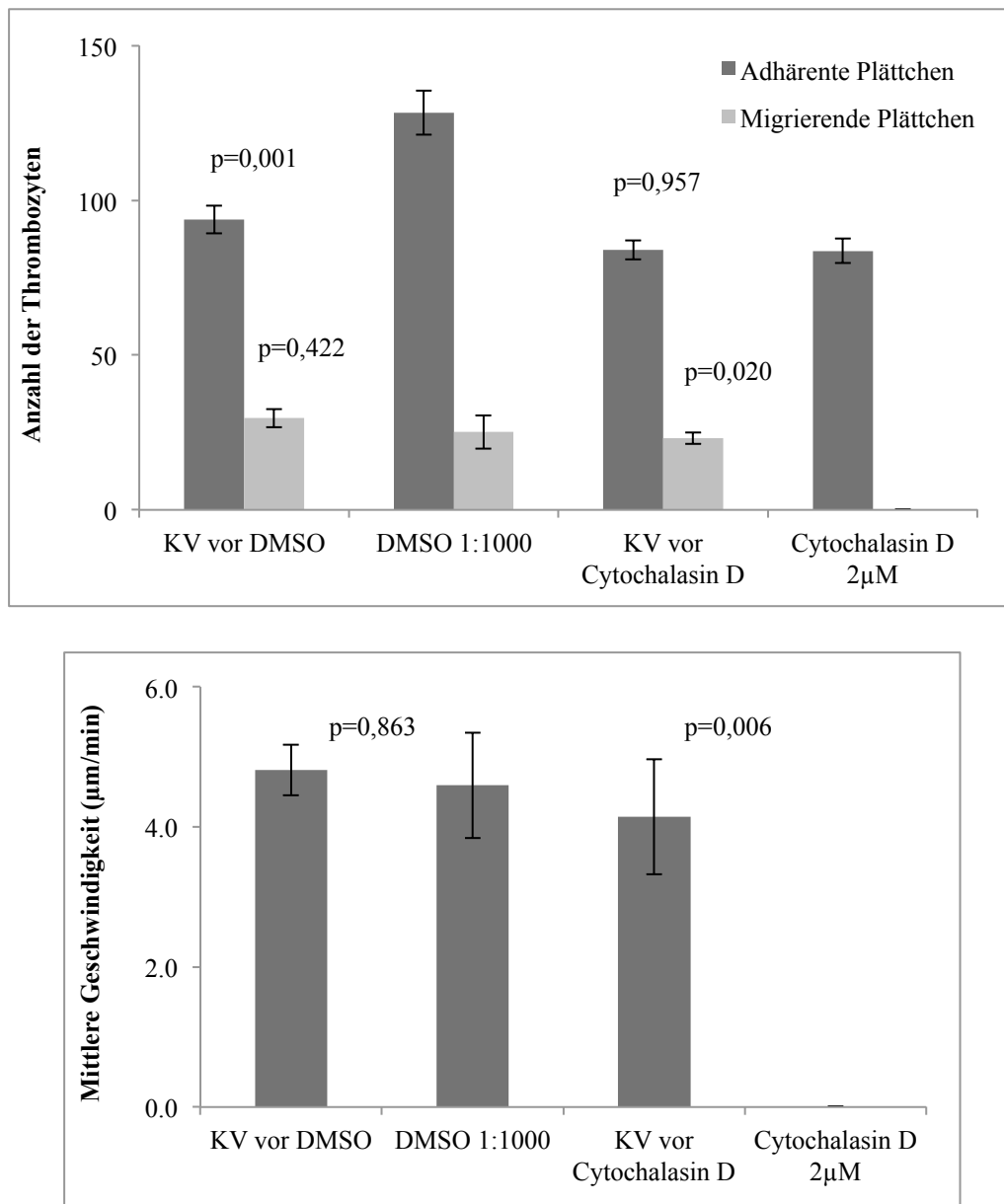


Abbildung 17: Wirkung von Inhibierung der Aktinpolymerisation auf Thrombozytenadhäsion und -migration.

Die Anzahl der adhärenen Thrombozyten nimmt nach Addition von DMSO signifikant zu ($p=0,001$), hingegen bleibt sie nach Addition von Cytochalasin D konstant ($p=0,957$). Die Anzahl der migrierenden Thrombozyten bleibt unter Wirkung von DMSO nahezu identisch ($p=0,422$), aber unter Wirkung von Cytochalasin D fällt abrupt und signifikant ab ($p=0,020$) und liegt sie bei 0 (oben). Die Geschwindigkeit der migrierenden Thrombozyten zeigt unter Wirkung von DMSO keine signifikante Veränderung ($p=0,863$) aber unter Wirkung von Cytochalasin D fällt sie signifikant auf 0 ab ($p=0,006$, unten) ($n=6$, gepaarter T-Test). Diese Ergebnisse wurden in abgeänderter Form (Abbildung 2C und 2D) im Paper (Gaertner et al., 2017) veröffentlicht.

Es ist bekannt, dass das Aktin-Myosin-Netzwerk sich bis zur Plasmamembran ausdehnt und durch die Verbindungen an die Plasmamembran bei Kraftvermittlung von Zellinneren in die Peripherie teilnimmt. Diese Verbindung ist essenziell für die Anpassung der Zellform an die wechselnde Migrations- und Kontraktionskräfte (Clarke and Spudich, 1977, Pollard and

Weihing, 1974). Aktinpolymerisation ist wichtig für die Bildung des Lammellipodiums. Wenn Cytohalasin D zugegeben wird, schrumpft aufgrund der fehlenden Aktinpolymerisation die Zellvorderkante (leading edge). Dadurch kann die Zelle keine Protrusion bilden und sich nicht mehr fortbewegen. Wenn die Verbindung zwischen Aktin-Myosin-Netzwerk und Plasmamembran durch die Inhibierung der Aktinpolymerisation durchbrochen wird, können die Thrombozyten ihre Form an die Zellinnerenkräfte nicht anpassen, welche mit der in der Versuchsreihe beobachteten morphologischen Veränderungen resultiert (siehe Abbildung 18).

10 μm

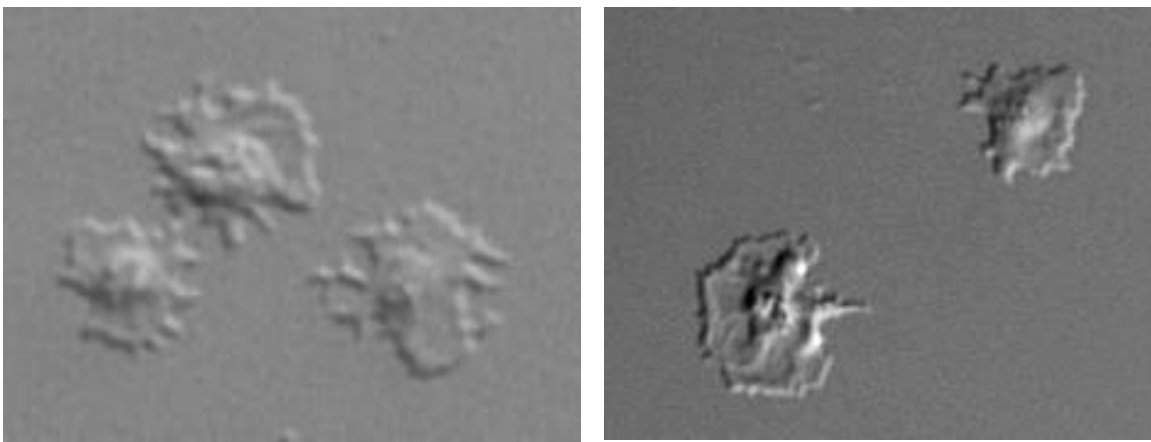


Abbildung 18: Morphologische Veränderungen der Thrombozyten unter Aktininhibierung mittels Cytochalasin D.

Runde Thrombozyten mit multiplen kleinen Ausläufern an der Membranoberfläche (spikes).

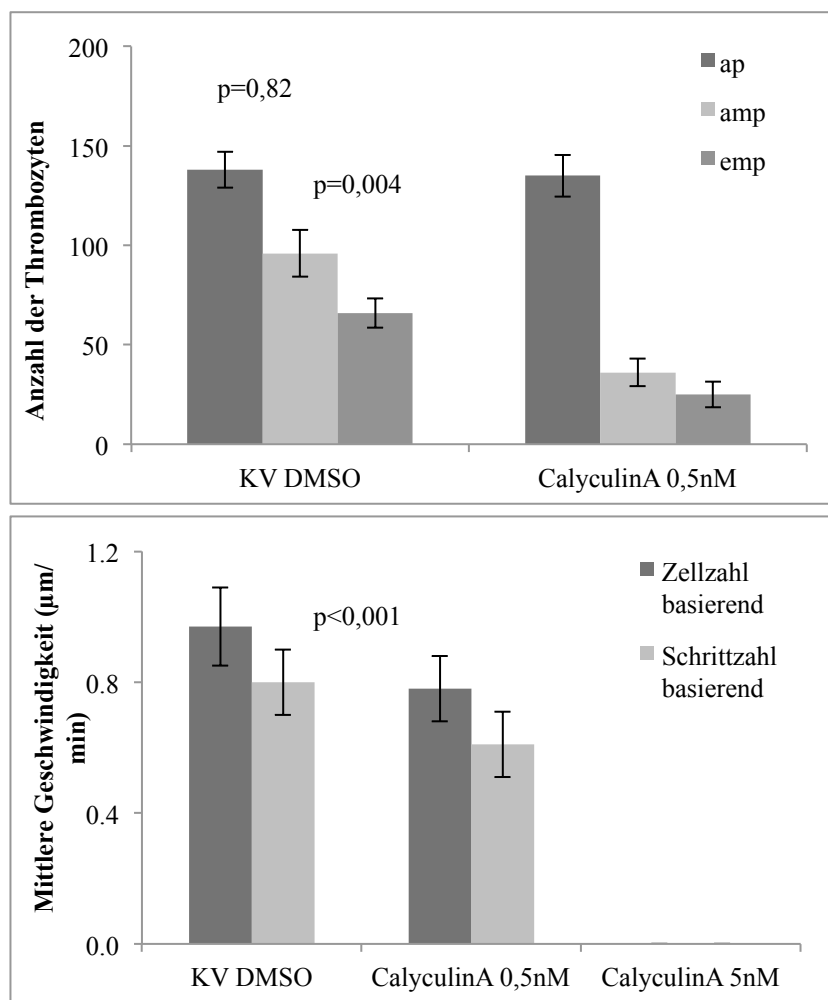
3.4 Calyculin A beeinflusst die Reorganisation der Zytoskelettelemente und verändert die Morphologie der Thrombozyten

Calyculin A ist ein potenter und spezifischer Inhibitor von Protein-Phosphatase 1/2A. Calyculin A inhibiert die Myosinleichtkettenphosphatase (MLCP) und steigert dadurch die Phosphorylierung von Myosinleichtketten. Die durch die Phosphorylierung aktivierten Myosinleichtketten verstärken die Aktin-Myosin-Verbindung (Stark et al., 1991). Entsprechend dieser Hypothese ist eine vermehrte Migrationsrate und schnellere Migration der Thrombozyten unter Behandlung mit Calyculin A zu erwarten.

In unserer Versuchsreihe haben wir nach unserem Protokoll die Thrombozyten isoliert und mit Thromboxan und ADP aktiviert. Vor der Aktivierung haben wir in die Versuchslösung Calyculin A und als Kontrollversuch DMSO addiert. Bei der Kontrollversuchsreihe mit

DMSO konnten die Thrombozyten ohne jegliche morphologische Veränderung mit einer konstanten Geschwindigkeit migrieren. Im Vergleich dazu migrierten die mit Calyculin A 0,5 nM behandelten Thrombozyten langsamer und ein Teil der Thrombozyten konnte gar nicht migrieren. Die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten war in beiden Gruppen gleich, aber die Anzahl der migrierenden Thrombozyten nimmt bei der Gruppe mit Calyculin A 0,5 nM signifikant ab. Der Anteil aller migrierenden Thrombozyten liegt in der Kontrollgruppe mit DMSO bei 70 % und in der Gruppe mit Calyculin A 0,5 nM bei 27 % (siehe Abbildung 19).

Der zu erwartende Effekt von Calyculin A mit zunehmender Migrationsgeschwindigkeit durch Inhibierung der MLCP trat in unserer Versuchsreihe im Vergleich zur Fischkeratozyten nicht auf (Yam et al., 2007). Stattdessen nimmt die Anzahl der migrierenden Thrombozyten unter Addition von Calyculin A ab. Dieses Ergebnis kann durch den Effekt von Calyculin A auf Fibrinogenrezeptoren erklärt werden. Calyculin A inhibiert die Freilegung von Fibrinogenrezeptoren bei von Thromboxan aktivierten Thrombozyten (Sakon et al., 1993).



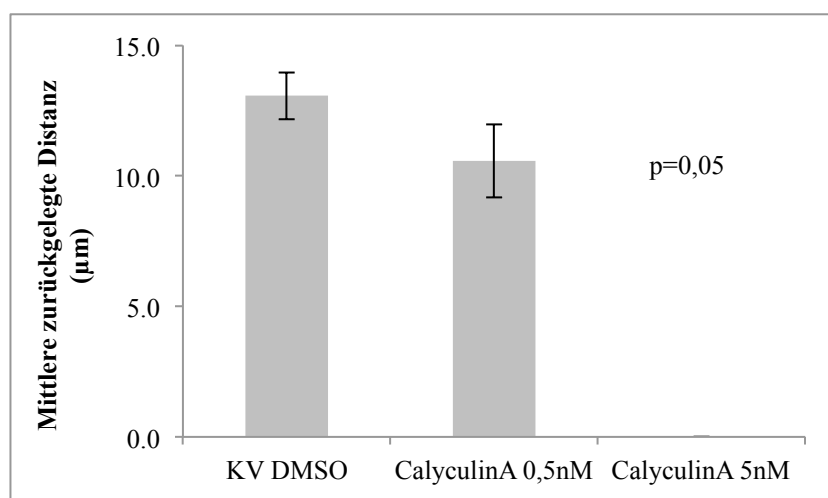


Abbildung 19: Wirkung von Calyculin A auf die Thrombozytenmigration.

Die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten bleibt unter Calyculin A 0,5 nM identisch zur Kontrollgruppe mit DMSO ($p=0,82$, T-Test), während die Anzahl der migrierenden Thrombozyten unter Wirkung von Calyculin A signifikant abnimmt ($p=0,004$, T-Test, oben). Die Migration wird unter Wirkung von Calyculin A 0,5 nM tendenziell langsamer und unter Wirkung von Calyculin A 5 nM findet sie nicht mehr statt ($p<0,001$, Mann-Whitney-U-Test, Mitte). Die zurückgelegte Distanz nimmt entsprechend zur Geschwindigkeit unter Wirkung von Calyculin A ab ($p=0,05$, Mann-Whitney-U-Test, unten). ($n=5$)

Nach einer Konzentrationserhöhung von 0,5 nM auf 5 nM änderte sich die Wirkung von Calyculin A auf Thrombozyten komplett. Die Thrombozyten zeigten unter Wirkung von Calyculin A 5 nM drastische morphologische Veränderungen. Ein großer Anteil von Thrombozyten konnte nicht adhärenent werden und eine Migration konnte nicht beobachtet werden. Die wenigen adhärenenten Thrombozyten bildeten anstatt Lamellipodien und Filopodien lange schmale Füßchen (Pseudopodien) (siehe Abbildung 20).

Calyculin A hat außer seiner Funktion als Protein-Phosphatase-1/2A-Inhibitor auch einen Effekt auf die Reorganisation von Zytoskelettelementen wie Aktinfilamente und Mikrotubuli (Yano et al., 1995). Bei inaktiven Thrombozyten liegen die Mikrotubulusbündel unter der Plasmamembran und die Aktinfilamente verteilen sich homogen im Zytoplasma. Eine Minute nach der Aktivierung von Thrombozyten mit Thromboxan werden die Mikrotubuli zentralisiert und die Organellen konzentrieren sich in der Zellmitte im Kontakt mit aus Mikrotubuli und Aktinfilamenten gebildeten Ringen (Towbin et al., 1979). Zehn Minuten nach der Aktivierung von Thrombozyten verschwinden viele Pseudopodien und die Mikrotubulusbündel werden zurück in die Peripherie gedrängt, wo sie sich irregulär verteilen. Die Behandlung der Thrombozyten mit Calyculin A führt zur Spaltung der Mikrotubulusbündel in kurze Fragmente. Viele der Mikrotubulifilamente verteilen sich zufällig im ganzen Zellkörper. Manche da-

von binden aneinander und an Aktinfilamente und bilden kurze Pseudopodien. Eine Vorbehandlung der Thrombozyten mit Calyculin A und folgend deren Aktivierung mit Thromboxan löst eine Reorganisation der Mikrotubuli aus. Sie bilden lange Pseudopodien bestehend aus parallel angeordneten langen Mikrotubuliketten. Die Aktinfilamente konzentrieren sich im Zellkörper. 10 Minuten nach der Aktivierung behalten die Mikrotubuli und Aktinfilamente ihre Position und dementsprechend die Thrombozyten ihre neue Form mit langen Pseudopodien (Yano et al., 1995). Diese durch Reorganisation der Aktin- und Mikrotubulifilamente entstandenen länglichen Füßchen (Pseudopodien) entspricht die Formveränderung in unserer Versuchsreihe mit Calyculin A 5 nM (siehe Abbildung 20).

Calyculin A beeinflusst unterschiedliche Zellprozesse und Zellbestandteile. Es ist ein potenter Inhibitor von Protein-Phosphatase 1/2A, kann zugleich die Freilegung von Fibrinogenrezeptoren inhibieren und hat einen Einfluss auf die Reorganisation von Zytoskelettelementen wie Aktinfilamente und Mikrotubuli. Der zu erwartende Phosphatase inhibierende Effekt, der die Kontraktilität und somit die Migrationsgeschwindigkeit erhöhen würde, konnte in unserer Versuchsreihe nicht beobachtet werden. Mit den Calyculinkonzentrationen, die in unseren Versuchsreihen benutzt wurden, konnten wir deren Effekt auf die Reorganisation der Mikrotubuli sehen.

10 μm

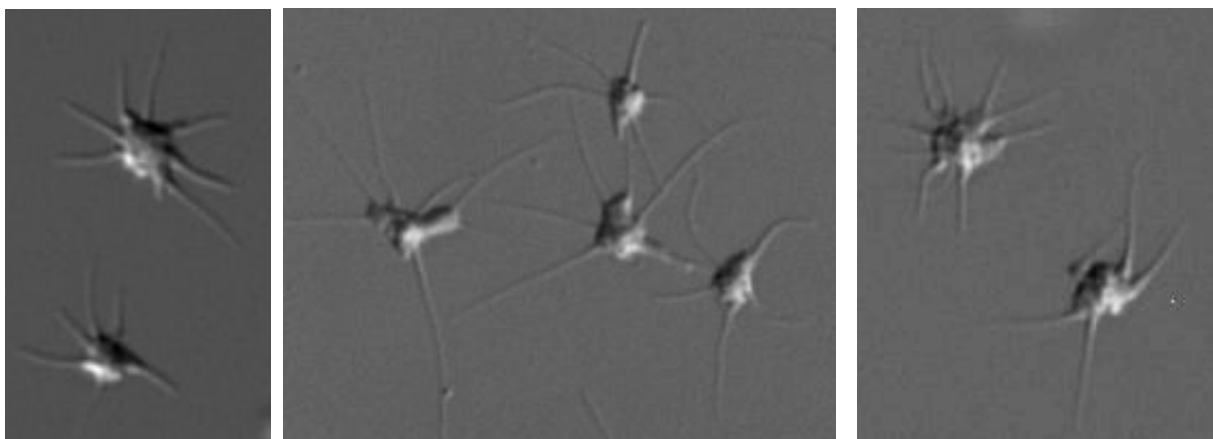


Abbildung 20: Morphologische Veränderungen unter Wirkung von Calyculin A. Die Thrombozyten bilden unter Gabe von Calyculin A multiple lange, schmale Füßchen (Pseudopodien).

3.5 Calcium als zentrales Ion in der Thrombozytenmigration

In in-vitro Versuchen mit Thrombozyten können wir in Abwesenheit von Serum keine Zellmigration beobachten. Wenn in die Versuchslösung kein Serum hinzugefügt wird, migrieren die Thrombozyten trotz der Aktivierung mit Thromboxan und ADP nicht (siehe Abbildung 25).

Aus diesen Ergebnissen können wir schlussfolgern, dass das Serum für die Adhäsion und Migration essenziellen Bestandteilen wie Proteine und Ionen beinhaltet. Für die Spezifizierung, der hier essenziellen Proteine und Ionen führten wir mehrere Versuchsreihen mit Serumionen und -proteinen. Als erstes wurde das Serumdialyseverfahren benutzt.

3.5.1 Serumdialyseverfahren mit Filtrierung von Calciumionen

In unserer ersten Versuchsreihe zur Suche von Ionen und Proteinen haben wir ein Serumdialyseverfahren benutzt. Durch dieses Verfahren werden alle Seruminhalte kleiner als 2 kDa unter anderem auch Calcium herausfiltriert. Die Filtration passiert durch eine Diffusion durch die Dialysemembran. In der Versuchsreihe mit dialysiertem Serum nimmt die Anzahl der migrierenden Thrombozyten im Vergleich zur Kontrollversuchsreihe mit Kontrollserum stark ab. Die Thrombozyten können sich weiterhin an die Oberfläche anheften, sodass die Anzahl der adhärenen Thrombozyten in beiden Gruppen nahezu identisch bleibt, aber nur 5-10 % der adhärenen Thrombozyten können bei den Versuchen mit dialysiertem Serum migrieren. Wenn in das dialysierte Serum jedoch Calcium 100 μ M hinzugefügt wird, kann eine Migration in gleicher Quantität wie bei Versuchen mit humanem Komplement-Serum beobachtet werden. Der Anteil von allein migrierenden Thrombozyten ist in beiden Gruppen fast identisch und liegt zwischen 52 und 55 %. Genauso zeigt die Migrationsgeschwindigkeit in beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied, während die Geschwindigkeit der Thrombozyten und dementsprechend die zurückgelegte Distanz bei der Versuchsreihe mit dialysiertem Serum einen signifikanten Abfall zeigt (siehe Abbildung 21).

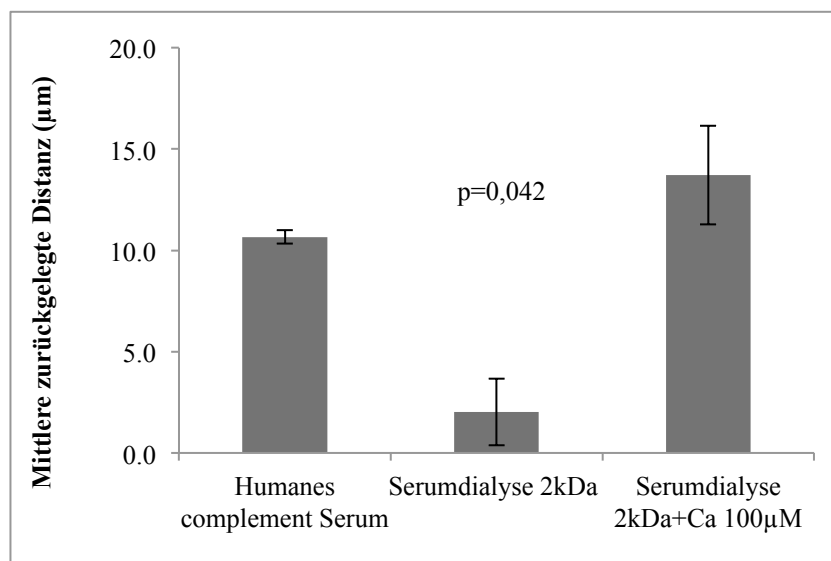
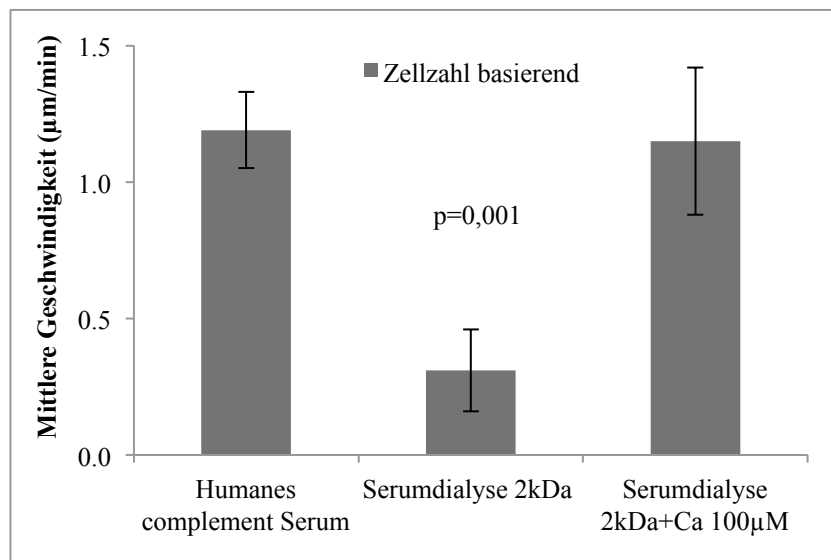
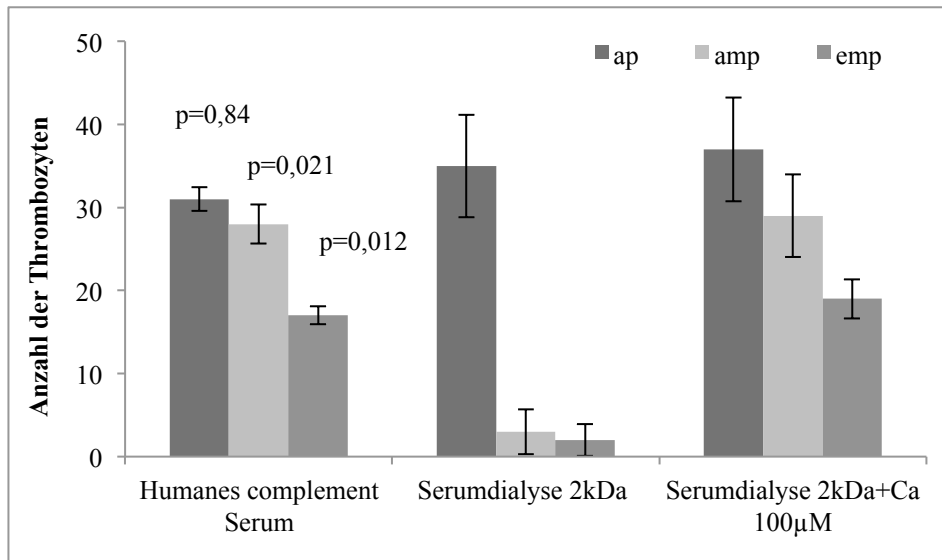
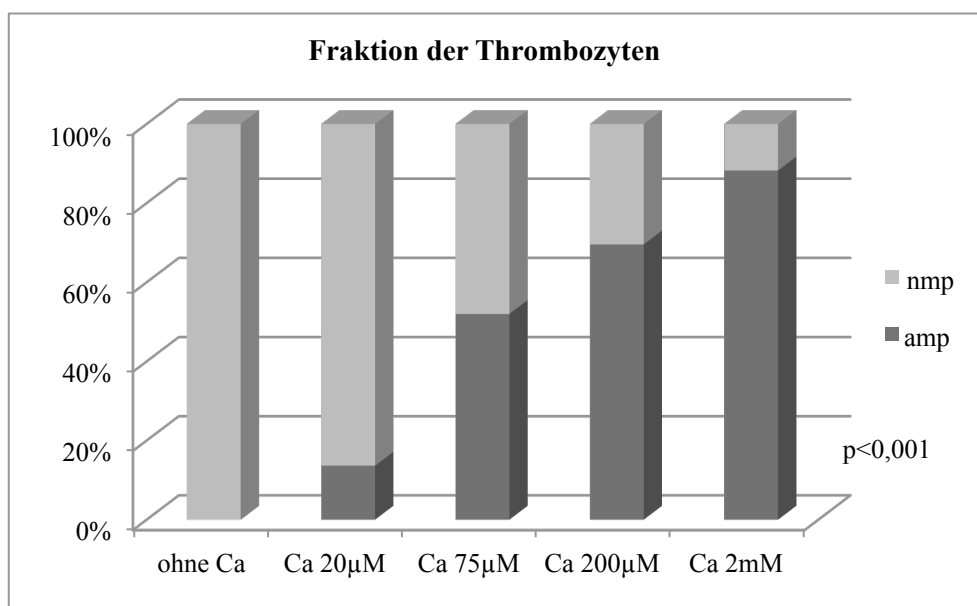


Abbildung 21: Wirkung der Filtration von Calciumionen aus dem Serum auf die Thrombozytenmigration.

Die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten bleibt identisch ($p=0,84$, T-Test, oben). Die Anzahl der migrierenden Thrombozyten nimmt bei Versuchen mit dialysiertem Serum signifikant ab ($p=0,012$ für einzeln migrierenden Thrombozyten und $p=0,021$ für alle migrierenden Thrombozyten, T-Test, oben). Die Geschwindigkeit ($p=0,001$, T-Test, Mitte) sowie die zurückgelegte Distanz ($p=0,042$, Mann-Whitney-U-Test, unten) sind bei den Versuchen mit dialysiertem Serum im Vergleich mit den Versuchen mit humanem Komplement-Serum und dialysiertem Serum mit Calcium signifikant geringer. ($n=3$)

3.5.2 Calciumkonzentrationsreihe zur Bestimmung der optimalen Calciumkonzentration für die Thrombozytenmigration

Es ist aus früheren Studien bekannt, dass die intrazelluläre Calciumkonzentration eine wesentliche Rolle in der Thrombozytenfunktion (Varga-Szabo et al., 2009) sowie in der Polarisation der migrierenden Zellen spielt (Brundage et al., 1991). Die Aktivierung der Zytoskelettelemente insbesondere Myosin mittels MLCK ist einen Calcium abhängigen Prozess, welcher für die Retraktion der Zellhinterkante zuständig ist (Yang and Huang, 2005). Mit den Ergebnissen aus der Serumdialyse-Versuchsreihe konnte nachgewiesen werden, dass Calcium für die Thrombozytenmigration essenziell ist. Anschließend erfolgte eine Versuchsreihe mit Calcium in unterschiedlichen Konzentrationen, um die optimale Calciumkonzentration für die Migration zu bestimmen. Die höchste Migrationsrate mit 88 % erreichen die Thrombozyten bei einer Konzentration von 2 mM Calcium. Bei 200 μ M Calcium ist der Anteil der migrierenden Thrombozyten weiterhin hoch, aber tendenziell geringer mit 70 %. Bei 75 μ M migrieren 50 % der Thrombozyten und bei 20 μ M migrieren nur noch 14 % der Thrombozyten. Dementsprechend sind die Geschwindigkeit und zurückgelegte Distanz mit 2 mM Calcium auch am höchsten und fallen mit abnehmender Calciumkonzentration ab (siehe Abbildung 22).



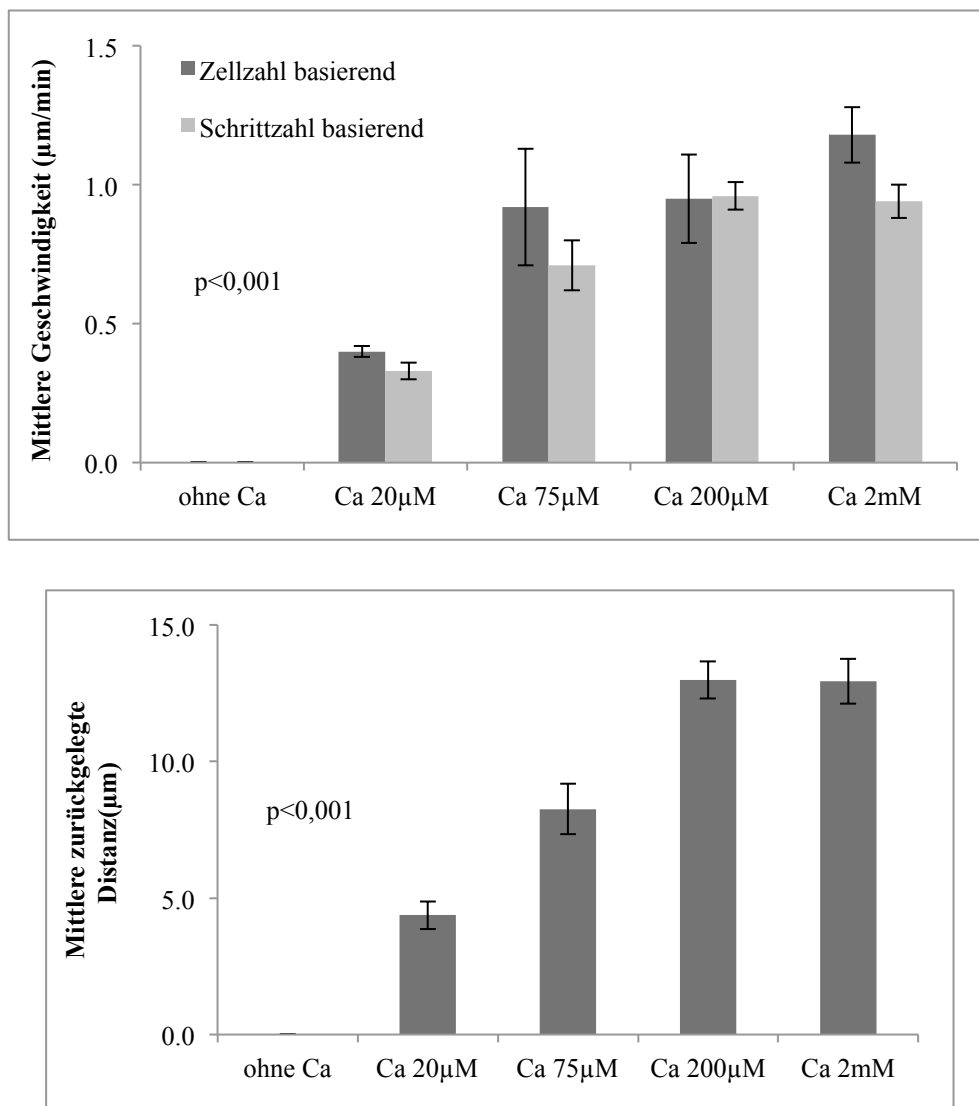


Abbildung 22: Calciumkonzentrationsreihe und Thrombozytenmigration.

Der Anteil der migrierenden Thrombozyten steigt mit zunehmender Calciumkonzentration signifikant an ($p < 0,001$, einfaktorielle Varianzanalyse, oben). Die Geschwindigkeit ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test, Mitte) sowie die zurückgelegte Distanz ($p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test, unten) steigen auch mit zunehmender Konzentration signifikant an und ist am höchsten bei 2 mM Calcium. ($n=3$)

3.6 Die Wirkung von anderen Ionen auf die Thrombozytenmigration

Nachdem die zentrale Rolle von Calciumionen in der Thrombozytenmigration festgestellt werden konnte, wurde die Wirkung von anderen Ionen auf die Thrombozytenmigration untersucht. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Magnesiumionen wie die Calciumionen sich an die CIB (Calcium- und Integrin bindende Proteine) binden und dadurch die $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine aktivieren können, welche an Fibrinogen binden und die Thrombozytenad-

häsion und –migration triggern (Yamniuk and Vogel, 2005, Tsuboi, 2002). Als weiteres können die Magnesiumionen wie die Calciumionen durch direkte Bindung, die Affinität der $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine zu ihren Liganden steigern (Hu et al., 1996).

Aufgrund von Studien, welche die ähnliche Wirkung von Magnesiumionen und Calciumionen auf die Thrombusformation beschreiben, wurden zuerst Versuchsreihen mit verschiedenen Magnesiumkonzentrationen durchgeführt, welche unter Wirkung von Magnesium anstatt Calcium einen deutlichen Abfall der Migrationsrate bis zum kompletten Ausfallen der Migration zeigte. Unter Verwendung von 200 μM Magnesium liegt die Migrationsrate bei 5 %, wohingegen unter Verwendung von 1 mM Magnesium gar keine Migration zu beobachten ist. Wenn zusätzlich zum Magnesium Calcium in identischer Konzentration in die Versuchslösung hinzugefügt wird, steigen die Migrationsraten jeweils auf 43 % und 45 % an. Die Geschwindigkeit sowie die zurückgelegte Distanz sind in der Versuchsreihe allein mit Magnesium geringer im Vergleich zur Versuchsreihe mit Magnesium und Calcium (siehe Abbildung 23).

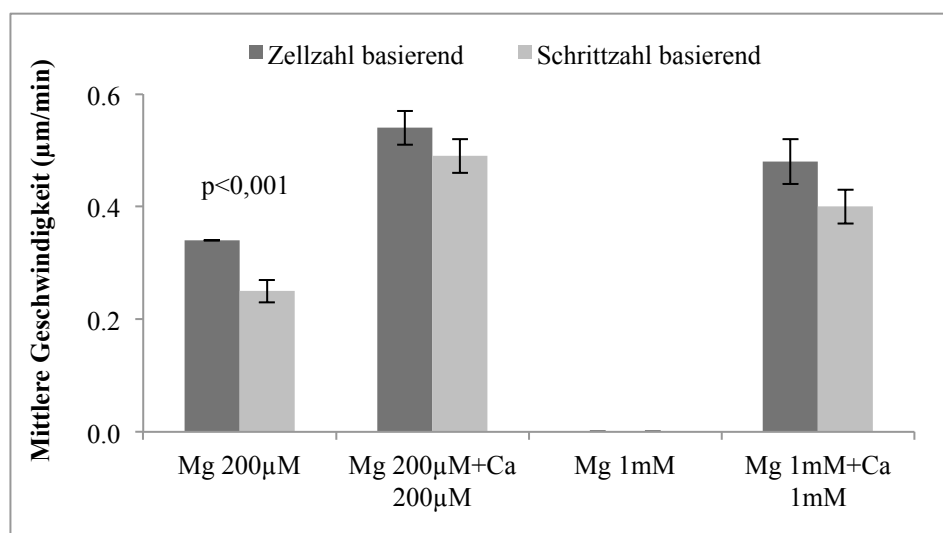
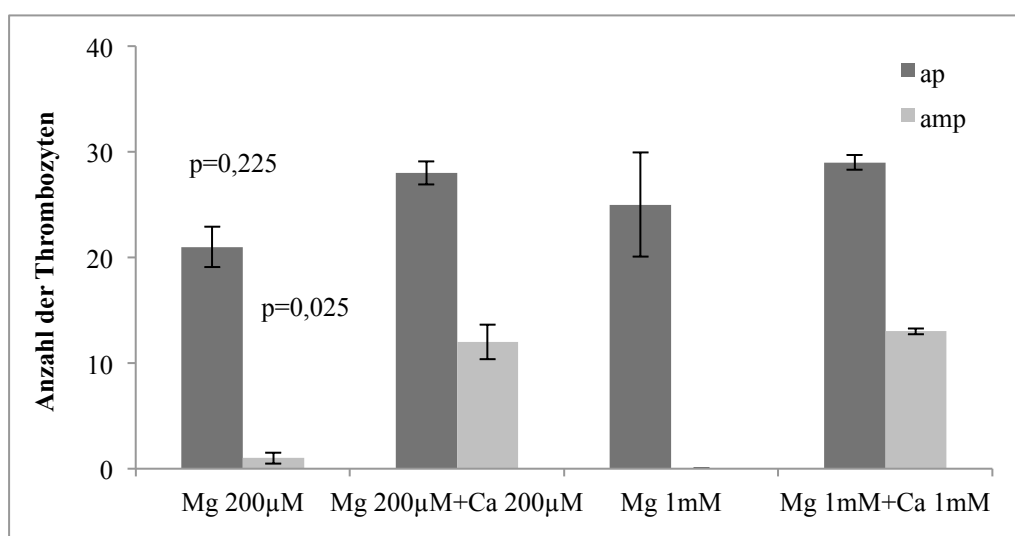


Abbildung 23: Wirkung von Magnesium auf die Thrombozytenmigration.

Die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten bleibt unter Wirkung von Magnesium unterschiedlicher Konzentration mit und ohne Calcium nahezu identisch ($p=0,225$, Kruskal-Wallis-Test) während die Anzahl der migrierenden Thrombozyten in den Gruppen mit Magnesium ohne Calcium signifikant weniger sind ($p=0,025$, Kruskal-Wallis-Test, oben). Die Migrationsgeschwindigkeit steigt unter Wirkung von Magnesium zusammen mit Calcium im Vergleich zum alleinigen Magnesium deutlich an ($p<0,001$, einfaktorielle Varianzanalyse, unten). In der Gruppe mit Magnesium 1mM wird keine Migration beobachtet. ($n=3$)

Die Migration in Anwesenheit von Magnesium kann durch die Modulation und Aktivierung von $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine mittels direkter Verbindung mit Magnesium erklärt werden. Außerdem können die $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine mittels der Verbindung zwischen Magnesium und CIB auch aktiviert werden. Die Integrinaffinität ist in Gegenwart von Magnesium höher als mit Calcium. Durch die stärkere Affinität von $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine an Fibrinogen werden die Thrombozyten mehr adhärenent an die Oberfläche, sodass die Migrationsrate stark abfällt. Die verminderte Migrationsrate kann auch durch den dosisabhängigen inhibierenden Einfluss von Magnesium auf die Agonisten der Thrombozytenaggregation bedingt sein. In den Versuchen mit Magnesium und Calcium entsteht eine Konkurrenz zwischen beiden Ionen für die direkte Bindung an $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine und CIB, wie bereits in Literatur beschrieben (Grzesiak et al., 1992, Yamniuk et al., 2004). Es ist bekannt, dass Calciumionen sich an einer weiteren Stelle der $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine binden können, welche einen inhibierenden Effekt auf die Integrin-Ligand-Verbindung hat (Hu et al., 1996). Dieser inhibierende Effekt kann die starke Adhäsion durch Magnesiumionen entgegenwirken und die Migration triggern. Die direkte Wirkung von Calcium in der Regulation der Zytoskelettelemente spielt vermutlich den im Vordergrund stehenden Effekt in der ansteigenden Migrationsrate und –Geschwindigkeit.

Als ein weiteres Ion wurde Mangan $200\text{ }\mu\text{M}$ benutzt, worunter mit oder ohne zusätzliche Calciumgabe keine Thrombozytenmigration beobachtet werden konnte. Mangan führt zur direkten Stabilisierung der aktiven Integrinkonformation (Smith et al., 1994). Es steigert dadurch die Affinität von $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine an ihren Liganden und fördert die Thrombozytenadhäsion an die Oberfläche. Der Grund von fehlender Migration kann die verstärkte Adhäsion sein.

Im Vergleich zu den beiden Ionen wird mit Calcium eindeutig die höchste Migrationsrate erreicht. Die Migrationsrate sowie die Migrationsgeschwindigkeit und die zurückgelegte Distanz sind unter der Kombination von Magnesium und Calcium signifikant geringer im Vergleich zum alleinigen Calcium. Diese Ergebnisse zeigen die zentrale Rolle von Calcium in der Thrombozytenmigration auf, die durch die anderen Ionen nicht adäquat ersetzt werden kann (siehe Abbildung 24). Alle drei Ionen haben einen Einfluss auf die Aktivität von $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -

Integrin, aber Calcium kann zusätzlich die Aktivität der Zytoskelettelemente steuern, sodass die für die Migration benötigte Protrusion- und Retraktionskräfte gebildet werden können.

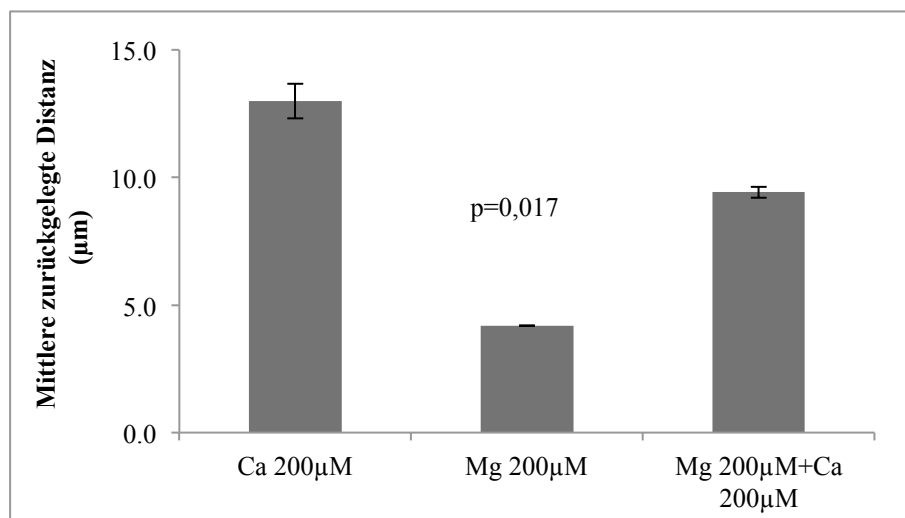
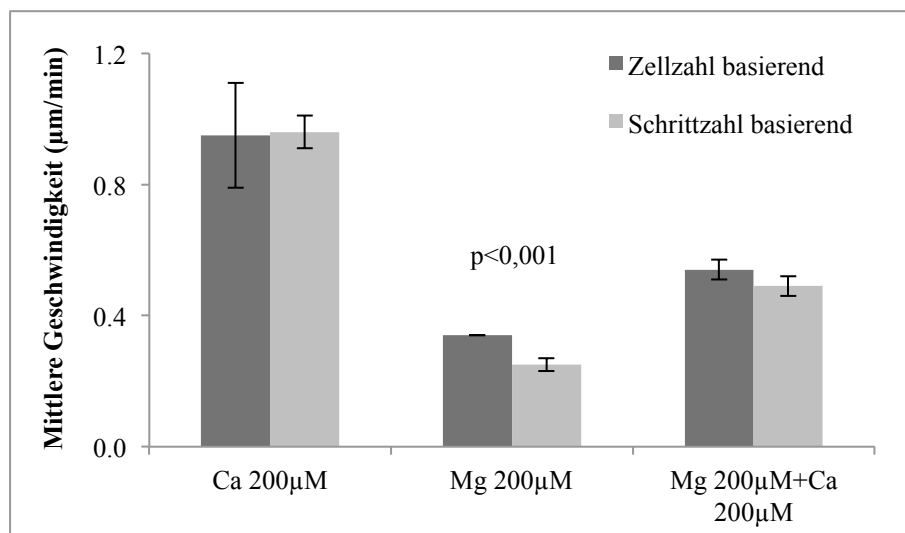
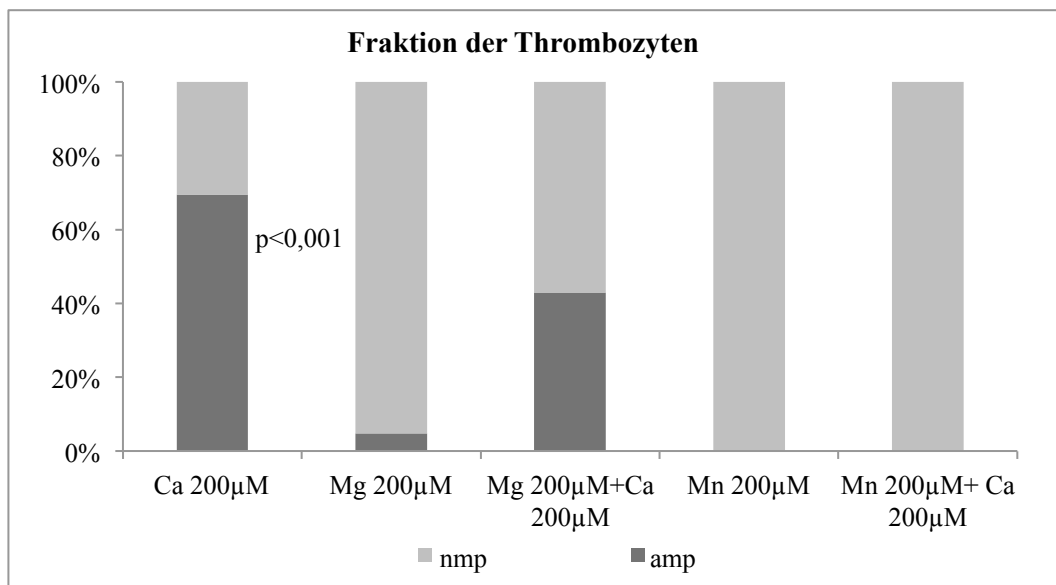


Abbildung 24: Vergleich der Wirkungen von Calcium und anderer Ionen auf die Thrombozytenmigration.

Der Anteil von migrierenden Thrombozyten ist bei Versuchen mit Magnesium niedriger im Vergleich zu den Versuchen mit Calcium und liegt bei Versuchen mit Mangan bei 0 % ($p < 0,001$, einfaktorielle Varianzanalyse, oben). Die Geschwindigkeit ($p < 0,001$, einfaktorielle Varianzanalyse, Mitte) und die zurückgelegte Distanz ($p = 0,017$, Kruskal-Wallis-Test, unten) sind unter Wirkung von Calcium am höchsten und fallen unter Wirkung von Magnesium anstatt Calcium signifikant ab. Unter Wirkung von Magnesium mit Calcium steigen die Geschwindigkeit und die hinterlegte Distanz im Vergleich zur Magnesium alleine signifikant auf, sind aber weiterhin niedriger als unter Wirkung von Calcium alleine. ($n=3$)

3.7 Albumin als essenzielles Protein für die Thrombozytenmigration

In den Versuchsreihen mit Calcium konnte die wichtige Rolle von Calcium als Serumion in der Thrombozytenmigration festgestellt werden. Wir konnten in diesen Versuchen ferner beobachten, dass Calcium alleine für die Migration nicht ausreichend ist und andere höher molekulare Serumbestandteile für die Migration benötigt werden. Weil Albumin in höheren Konzentration im Serum vorkommt und einen anti-adhäsiven Effekt auf die Thrombozyten hat, welche den adhäsiven Effekt von Fibrinogen entgegenwirken kann (Park et al., 1991), wurden Versuche durchgeführt, in denen anstatt humanen Komplement-Serum Albumin benutzt wurde. Nach unserer Hypothese soll die Kombination von Albumin und Calcium die Thrombozytenmigration ermöglichen und die Rolle von Serum auf die Thrombozytenmigration ersetzen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Versuche mit Calcium ohne Albumin, Albumin ohne Calcium, mit Albumin und Calcium kombiniert und ohne beide durchgeführt. In der Versuchsreihe ohne Albumin konnte keine Migration beobachtet werden, wobei die Adhäsion unbeeinträchtigt in allen Versuchsgruppen stattfand. Genauso war eine Migration nur mit Albumin ohne Calcium nicht möglich. Unter diesen Versuchsgruppen kann die Migration nur unter Verwendung von Calcium und Albumin zusammen beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterstützen das Argument, dass Albumin und Calcium für die Thrombozytenmigration essenzielle Serumbestandteile sind und durch die Kombination von beiden die Rolle von Serum in der Thrombozytenmigration ersetzt werden kann (siehe Abbildung 25).

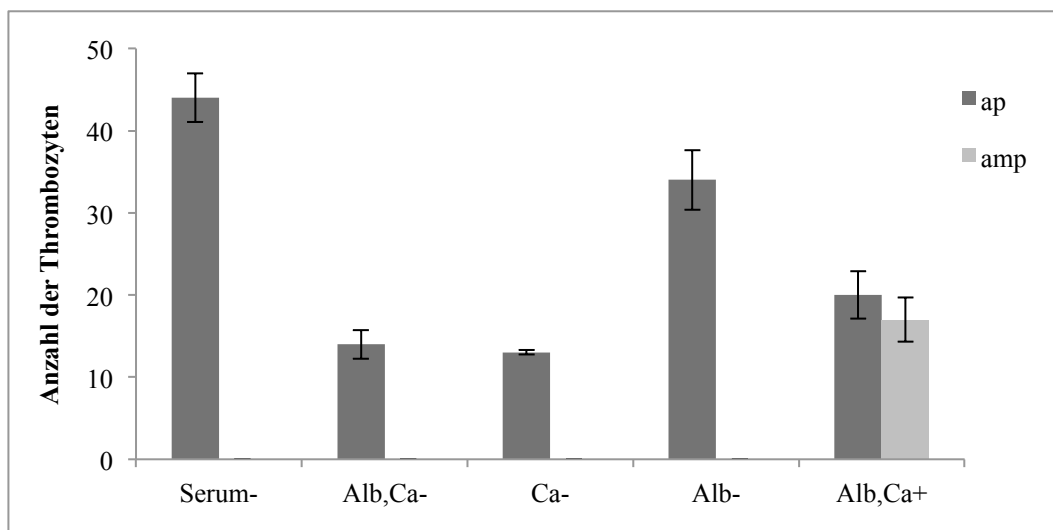


Abbildung 25: Adhäsion und Migration unter Verwendung von Albumin, Calcium oder Serum.

In den Versuchen ohne Serum sowie ohne Calcium und Albumin findet keine Migration. Alleine Albumin oder Calcium kann die Migration nicht triggern. Nur unter Kombination von Albumin und Calcium findet die Thrombozytenmigration statt. (n=3)

Anschließend wurde eine Versuchsreihe mit Albumin in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. In diesen Versuchen wurde Calcium 75 μ M benutzt. In der Albuminkonzentrationsreihe steigt der Anteil an migrierenden Thrombozyten mit zunehmender Albuminkonzentration an. Mit Albumin 0,13 % ist der Anteil bei 40 % und mit Albumin 0,5 % bei 58 %. Ab Albumin 2 % können die Thrombozyten nicht mehr an der Oberfläche anheften. Der mit der zunehmenden Albuminkonzentration ansteigende anti-adhäsive Effekt von Albumin überwindet den adhäsiven Effekt von Fibrinogen ab Albuminkonzentration von 2%, sodass die Migrationsrate drastisch abfällt. Die Migration kann wegen geringer Anzahl der migrierenden Thrombozyten nicht genau beobachtet werden, wobei die wenigen adhären und migrierenden Thrombozyten im Vergleich zu den Thrombozyten mit niedrigerer Albuminkonzentration schneller migrieren (siehe Abbildung 26).

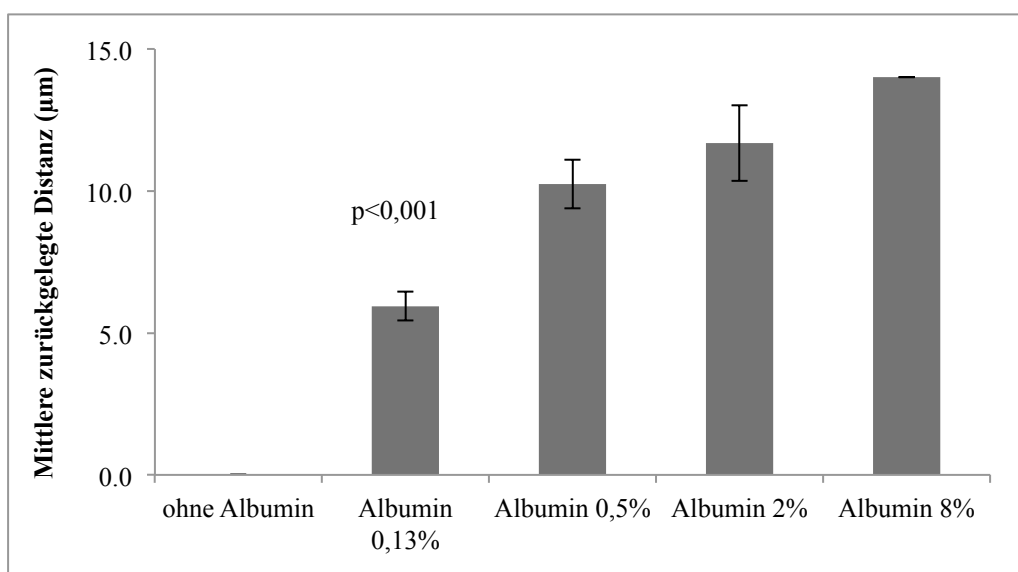
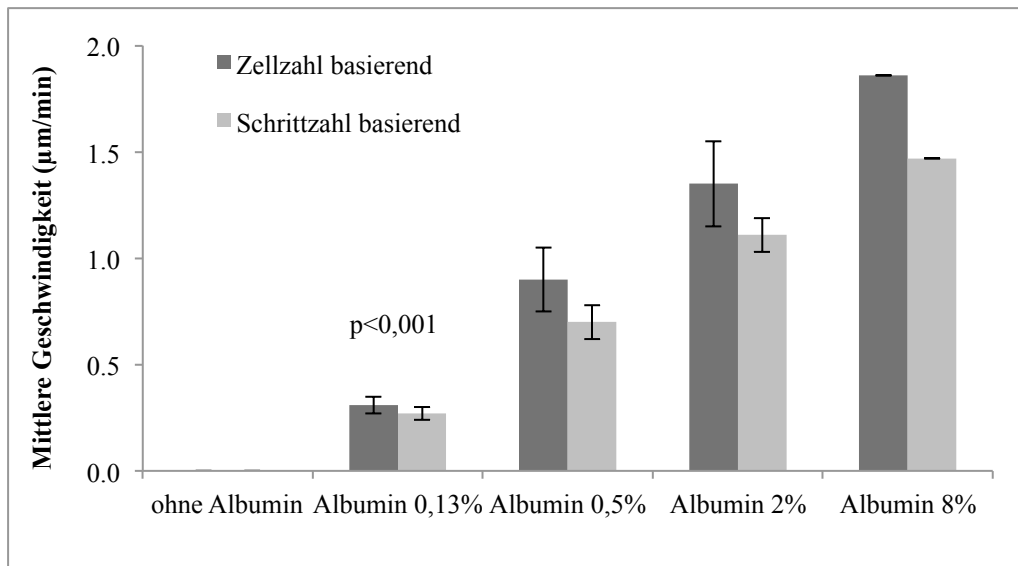
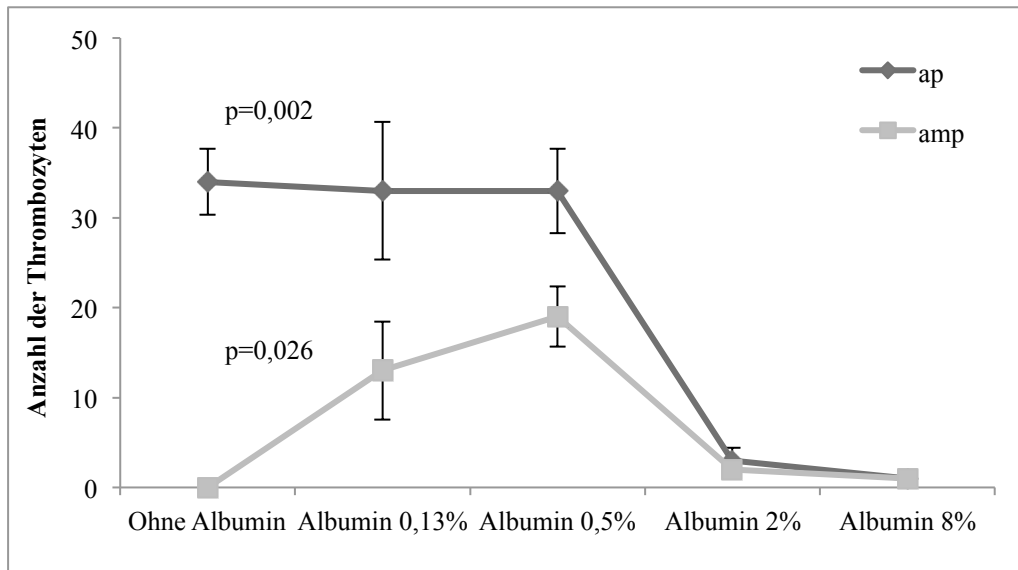


Abbildung 26: Albuminkonzentrationsreihe und Thrombozytenmigration.

Die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten ist in den Gruppen mit Albumin 0,13% und Albumin 0,5% fast identisch und nimmt ab Albuminkonzentration von 2 % ab ($p=0,002$, einfaktorielle Varianzanalyse, oben). Die Anzahl der migrierenden Thrombozyten erreicht ihr Maximum mit Albumin 0,5 % und fällt danach mit zunehmender Albuminkonzentration ab ($p=0,026$, einfaktorielle Varianzanalyse, oben). Die Geschwindigkeit ($p<0,001$, einfaktorielle Varianzanalyse, Mitte) und die zurückgelegte Distanz ($p<0,001$, Kruskal-Wallis-Test, unten) liegen bei den Versuchen ohne Albumin bei 0 und steigen mit zunehmender Albuminkonzentration an. ($n=3$)

Um die Wirkung von Albumin-Calcium-Kombination mit Serum zu vergleichen, erfolgte eine Versuchsreihe mit Albumin 0,5% und Calcium $75\mu\text{M}$. Wenn die Albuminkonzentration mittels Albuminanteil im Serum berechnet wird, entspricht Albumin 0,5 % ungefähr der Serumkonzentration. Wenn die Ergebnisse von Versuchsreihen mit Albumin 0,5 % und humanem Komplement-Serum verglichen werden, sind der Anteil der migrierenden Thrombozyten sowie die Migrationsgeschwindigkeit in beiden Gruppen nahezu identisch. Die minimalen Unterschiede zwischen zwei Gruppen in beiden Varianten sind nicht signifikant. (siehe Abbildung 27).

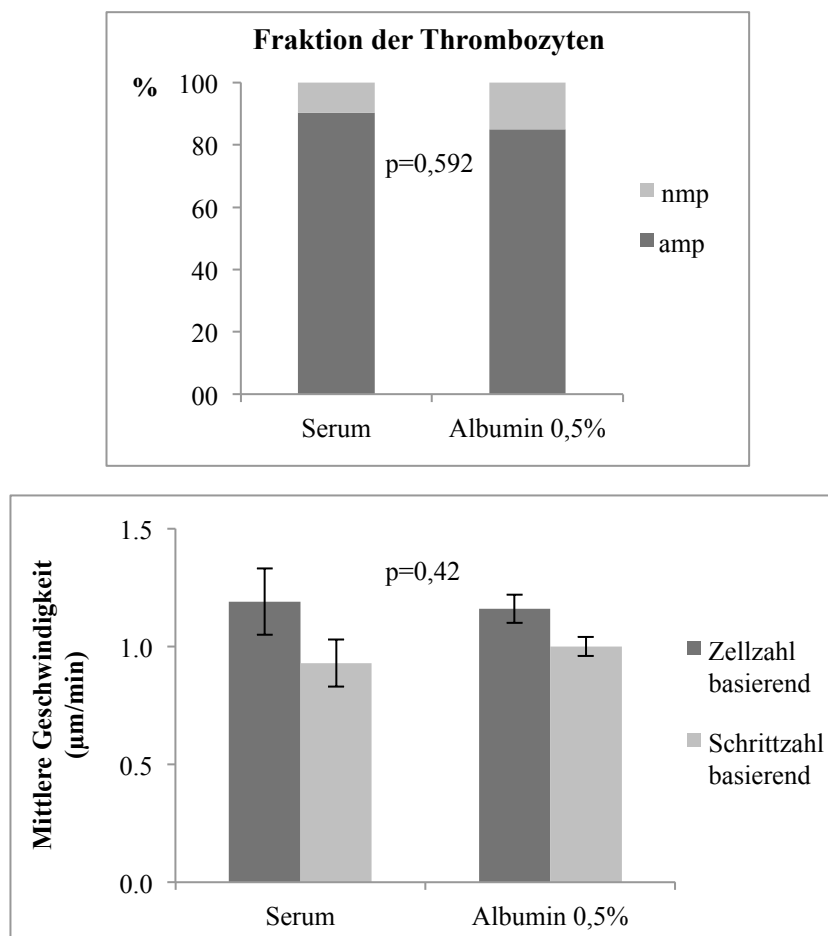
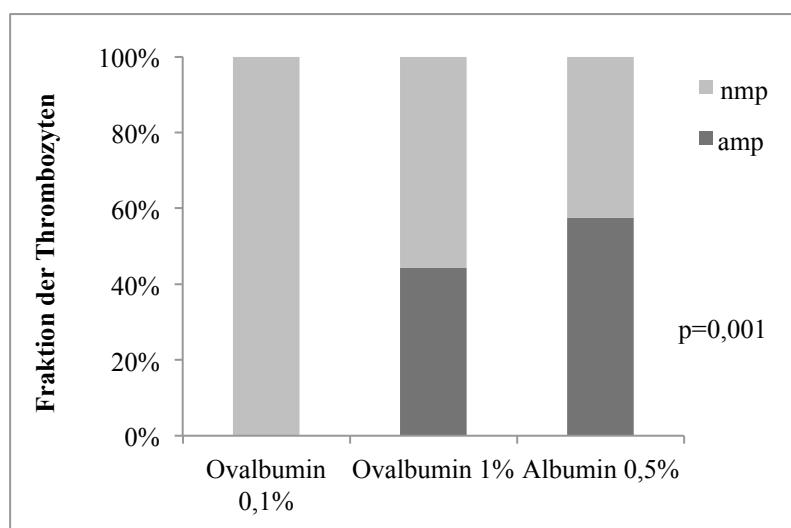


Abbildung 27: Vergleich von Albumin mit humanem Komplement-Serum.

Der Anteil an migrierenden Thrombozyten ($p=0,592$, T-Test, oben) sowie die Migrationsgeschwindigkeit ($p=0,42$, T-Test, unten) zeigen zwischen den Versuchsgruppen mit Serum und Albumin 0,5 % keinen signifikanten Unterschied ($n=3$). Diese Ergebnisse wurden in abgeänderter Form (Abbildung 3E und 3G) im Paper (Gaertner et al., 2017) publiziert.

3.8 Die Wirkung von anderen Proteinen auf die Thrombozytenmigration

Es ist bekannt, dass andere Proteine wie Ovalbumin und Casein auch einen anti-adhäsiven Effekt wie Albumin haben, sodass wir Versuche mit beiden Proteinen anstatt Albumin durchführten. In den Versuchen mit Ovalbumin oder Casein konnte auch eine Migration beobachtet werden. Für diese Versuchsreihen mit verschiedenen Proteinen wurde ein Thyrodespuffer ohne Zusatz von BSA (Bovine Serum Albumin) hergestellt. In der Versuchsreihe mit Ovalbumin, das Hauptprotein im Eiweiß, zeigt sich eine Migration bei einer Ovalbuminkonzentration von 1 %. Der Anteil an migrierenden Thrombozyten liegt bei 45 %. Mit Ovalbumin 0,1 % werden die Thrombozyten adhären, aber eine Migration findet nicht statt. Im Vergleich der Ergebnisse aus der Versuchsreihe mit den Versuchen mit Albumin 0,5 % kann festgestellt werden, dass der Anteil der migrierenden Thrombozyten mit 45 % und 57 % nah aneinander liegt. Die Thrombozyten migrieren unter Wirkung von Ovalbumin 1 % im Vergleich zu Albumin 0,5 % deutlich langsamer (siehe Abbildung 28).



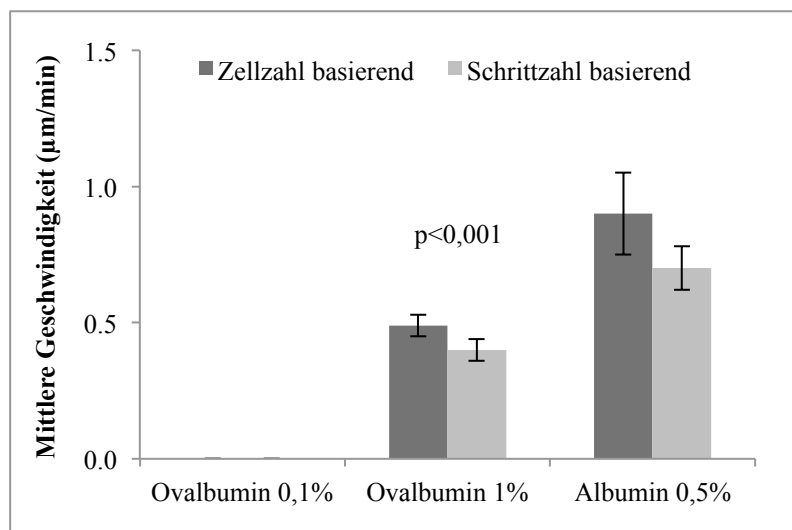


Abbildung 28: Vergleich der Wirkung von Albumin und Ovalbumin auf die Thrombozytenmigration.

Sowohl der Anteil an migrierenden Thrombozyten ($p=0,001$, einfaktorielle Varianzanalyse, oben) als auch die Migrationsgeschwindigkeit ($p<0,001$, Kruskal-Wallis-Test, unten) zeigen unter Wirkung von Ovalbumin 0,1 %, Ovalbumin 1 % und Albumin 0,5 % signifikante Unterschiede. Unter Wirkung von Ovalbumin 0,1% findet keine Migration statt. Die Migrationsrate sowie die Migrationsgeschwindigkeit sind unter Wirkung von Ovalbumin 1% geringer als unter Wirkung von Albumin 0,5%. ($n=3$)

Eine weitere Versuchsreihe wurde mit Casein, einem Protein das in Säugetierenmilch vorkommt, durchgeführt. Bei einer Verwendung von Casein 0,25 % werden die Thrombozyten adhären und die Migrationsrate liegt hoch bei 90 %. Die mittlere Geschwindigkeit bei der Versuchsreihe mit Casein 0,25 % beträgt 1,32 µm/min und ist ähnlich wie die Geschwindigkeit bei der Versuchsreihen mit humanem Komplement-Serum. Gleiche Versuche wurden mit Tryptocasein 0,25 %, eine mit Trypsin verdauten Form von Casein, durchgeführt. Mittels dieses Verdauungsprozesses werden die intakten Proteine in kleine Anteile gespalten. In dieser Versuchsreihe werden die Thrombozyten adhären, eine Migration findet allerdings nicht statt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Thrombozyten für die Migration intakte Proteine benötigen. Wenn die Struktur und die Zusammensetzung der Proteine durch verschiedene Prozesse zerstört werden, können diese die Migration nicht mehr fördern (siehe Abbildung 29).

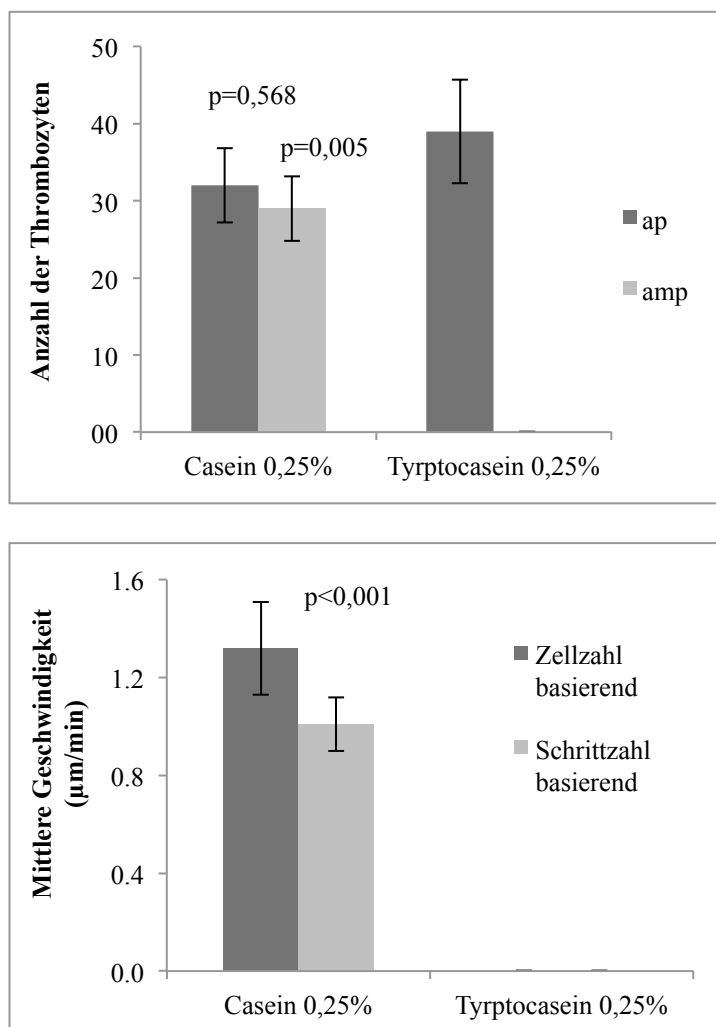


Abbildung 29: Wirkung von verdauten Proteinen auf die Thrombozytenmigration.

Unter Wirkung von Casein 0,25 % und Tryptocasein 0,25% zeigen die Anzahl an adhären-ten Thrombozyten keinen ($p=0,568$, T-Test, oben), die Anzahl an migrierenden Thrombozyten hingegen einen signifikanten Unterschied ($p=0,005$, T-Test, oben). Die Migrationsgeschwindigkeit liegt in der Gruppe mit Tryptocasein 0,25 % bei 0, während die Geschwindigkeit in der Gruppe mit Casein 0,25 % im Bereich der Kontrollversuche liegt ($p<0,001$, T-Test, unten). ($n=3$)

In einer weiteren Versuchsreihe wurde anstatt Albumin oder Serum, BSA (Bovine Serum Albumin) benutzt. In der Vergleichsgruppe wurde mit Trypsin verdautes BSA verwendet. Die Ergebnisse aus dieser Versuchsreihe bestätigen die aus der Casein-Versuchsreihe. Eine Adhäsion kann unter Wirkung von verdaulichem BSA weiterhin stattfinden, während eine Migration nicht mehr beobachtet werden kann. Dementsprechend liegt die Migrationsgeschwindigkeit in der Gruppe mit verdaulichem BSA genauso wie in der Gruppe mit Tryptocasein bei 0 (siehe Abbildung 30).

Die Ergebnisse aus den Versuchsreihen mit Albumin, Casein und Ovalbumin zeigen, dass die Thrombozyten für die Migration außer Calcium als weitere Serumkomponente Proteine brauchen. Nur unter Verwendung von Proteinen zusammen mit Calcium anstatt Serum kann eine

Migration stattfinden. Aufgrund des großen prozentualen Anteils im Serum kann als essenzielles Protein für die Thrombozytenmigration Albumin identifiziert werden. Wie in-vitro Versuchen gezeigt haben, kann die Wirkung des Albumins durch andere Proteine ersetzt werden.

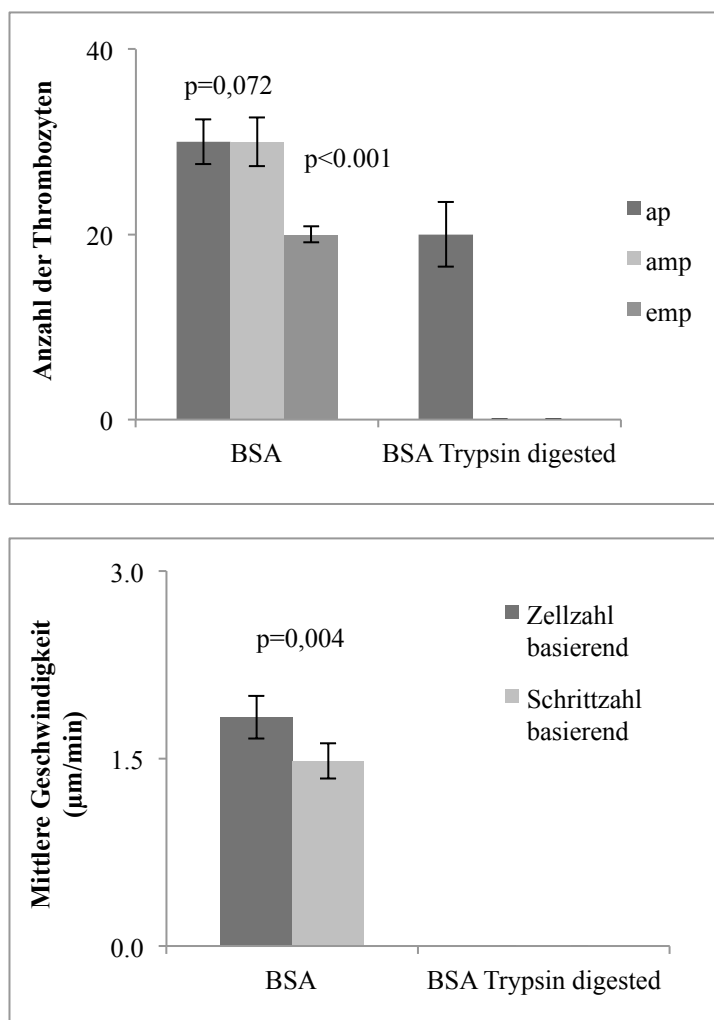


Abbildung 30: Wirkung der Verdauung von Albumin auf die Thrombozytenmigration. In den Versuchen mit verdautem Albumin liegt die Anzahl der migrierenden Thrombozyten bei 0 ($p<0,001$, T-Test, oben), während die Anzahl der adhärenenten Thrombozyten keinen signifikanten Unterschied zeigt ($p=0,072$, T-Test, oben). Unter Wirkung von verdautem Albumin findet keine Migration, sodass die Geschwindigkeit auch bei 0 liegt ($p=0,004$, Mann-Whitney-U-Test, unten). ($n=3$)

Nach einer Aktivierung werden die Thrombozyten durch die Verbindungen zwischen Integrine und Fibrinogen an der Oberfläche adhärenent. Damit sie sich auf der Oberfläche bewegen können, soll der adhäsive Effekt von Fibrinogen-Integrin-Interaktion vermindert werden, welche durch anti-adhäsiven Effekt von Serumalbumin ermöglicht wird. Für die Fortbewegung brauchen die Thrombozyten die Aktivierung der Zytoskelettelemente, welche durch die Bildung von Zellkontraktionsmaschine die Kräfte für die Protrusion an der Vorderkante und die

Retraktion an der Hinterkante generieren und im Zytoplasma verteilen. Die Aktivierung der Zytoskelettelemente kann durch Calciumeinstrom reguliert werden. Insbesondere die Myosin II Aktivierung und Retraktion an der Hinterkante wird von intrazellulärem Calcium getriggert (Lee et al., 1999). In Betracht dieser Ergebnisse können Albumin und Calcium als die Serumbestandteile, die in der Thrombozytenmigration eine wichtige Rolle spielen, identifiziert werden.

4 Diskussion

Die früheren Studien zeigten uns, dass die Thrombozyten sich spontan (Valone et al., 1974) oder gezielt in eine Richtung (Lowenhaupt, 1978) migrieren können. Bei einem Zellschaden bewegen sich die Thrombozyten zu den geschädigten Zellen um dort die Immunreaktion zu starten (Czapiga et al., 2004). Sie können auch nach der Aktivierung durch Allergene extravaskulär migrieren und bei der allergisch getriggerten Entzündungsreaktion direkt teilnehmen (Pitchford et al., 2008). In weiteren Studien aus einer Arbeitsgruppe aus Tübingen wurde festgestellt, dass die Thrombozyten von SDF-1 (stromal cell derived factor 1) stimuliert werden und auf der Oberfläche durch das Endothel in Richtung von SDF-1 migrieren können (Kraemer et al., 2010). Die Thrombozyten häufen sich in den Bereichen mit erhöhter SDF-1-Konzentration an. Sie reagieren auf die Scherkräfte mit Reorganisation ihrer Zytoskelettelemente, Polarisation und strömungsgerichteter Migration (Kraemer et al., 2011). In einer in-vivo-Untersuchung wurde beobachtet, dass die Thrombozytenmigration nach vaskulärer Entzündung in den Zellen mit SDF-1 negativen Mäusen im Vergleich zum SDF-1 Positiven weniger ausgeprägt ist (Schmidt et al., 2012). Ein Zusammenhang zwischen Thrombozytenmigration und Aktivität der Ionenkanäle insbesondere von Calciumkanal Orai1 und Kaliumkanal SK4 wurde ebenfalls beobachtet (Schmidt et al., 2011). In den letzten Jahren wurde spezifisch über Thrombozytenmigration keinen weiteren Studien durchgeführt, sodass die Kenntnisse über die Thrombozytenmigration wie Einflussfaktoren, regulierende Stoffe, essentielle Strukturen, begrenzt sind. Aus diesem Grund war die Etablierung einer Methode zur in-vitro-Analyse der Thrombozytenmigration eine wichtige Grundlage für weitere Forschung in diesem Bereich. Mit der HMDS-Beschichtung konnte das Störfaktor durch die Glasoberfläche und deren Interaktionen mit Proteine, die Liganden von Integrinen, eliminiert werden, sodass eine ausreichende Adhäsion mit gleichzeitiger aussagekräftiger Migration beobachtet werden konnte. Die Vorkenntnisse über die Migration anderer Zellarten leitete die Suche nach essentiellen Bestandteilen der Thrombozytenmigration.

4.1 Die Rolle des GPIIb/IIIa-Komplexes in der Thrombozytenmigration

Es ist bekannt, dass das Ausmaß der Zellmigration von der Aktivität des Integrin-Ligand-Komplexes abhängig ist, welche wiederum durch die Ligandkonzentration, die Integrin-Expression der Zelle und die Bindungsaffinität vom Integrin-Ligand abhängig ist (Bauer et al., 1992, DiMilla et al., 1993, Huttenlocher et al., 1996). Der GPIIb/IIIa-Komplex ist einer von den am häufigsten vorkommenden und wichtigsten Integrin-Ligand-Komplexen der Thrombozyten, der die Thrombusformation reguliert. Die Affinität des Integrin-Ligand-Komplexes wird durch Inside-out- und outside-in-signaling verstärkt. Gleichzeitig kann durch die Aktivierung von Integrin die Konfiguration der Rezeptoren geändert werden. Es ist bekannt, dass die RGD-Domäne die Affinität der Verbindung zwischen Fibrinogen und Rezeptor erhöht (Mohri and Ohkubo, 1993), umgekehrt wird die Affinität durch die Blockierung der Verbindung mit RGD-Analoga vermindert (Peerschke and Galanakis, 1987). Um die Wirkung der RGD-Domäne und des GPIIb/IIIa-Komplexes auf die Thrombozytenmigration zu quantifizieren, wurden in dieser Arbeit Versuche mit RGD-Analoga und mit spezifischen Rezeptor-Antagonisten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass die direkte Inhibition des GPIIb/IIIa-Komplexes zu einer kompletten Verhinderung der Migration führt. Nach der Gabe von Abciximab kann keine einzige Zelle mehr migrieren (siehe Abbildung 12). Im Vergleich dazu wird es beobachtet, dass unter Wirkung von RGD-Analoga die Qualität sowie die Quantität der Thrombozytenmigration nur vermindert werden. Die Anzahl der migrierenden Thrombozyten, ihre Geschwindigkeit und somit die von ihnen zurückgelegte Distanz nehmen ab, aber weiterhin kann ein Teil der Thrombozyten migrieren (siehe Abbildung 11). Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Aktivierung der Thrombozyten trotz der Inhibition von RGD-Domänen über andere freie Kontaktstellen des Rezeptors erfolgen kann. Diese freien Kontaktstellen werden von den Liganden besetzt und dadurch werden die Kaskaden aktiviert und eine Migration kann stattfinden.

Abciximab wird bereits für die Verhinderung von Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung während und nach perkutanen koronaren Interventionen verwendet. Durch die Wirkung von Abciximab können frühzeitige Reinterventionen und die ischämischen Komplikationen signifikant reduziert werden (Investigators, 1994, Tchong et al., 2003). Gleichzeitig steigt als unerwünschte Wirkung das Risiko einer Blutung. Das RGD-Analogon, Tirofiban wird auch für die Verhinderung einer Thrombosebildung im Rahmen eines akuten ischämischen koronaren Syndroms benutzt. In dieser Arbeit konnte die Wirkung der RGD-Analoga auf die Thrombozytenmigration qualitativ und quantitativ gezeigt werden. Im Vergleich zur

Abciximab kann durch die RGD-Analoga eine reduzierte Aktivierung und Migration der Thrombozyten erreicht werden, ohne die Migration komplett zu verhindern. Durch weitere Forschung über die RGD-Analoga mit in-vivo Versuchen kann die Wirkung unter physiologischen Bedingungen rausgefunden und eine geeignete Dosierung für eine gezielte und kontrollierte Hemmung der Thrombozytenmigration bestimmt werden, welche eine unerwünschte Thrombusbildung oder durch eine Überdosierung auftretende Blutungen verhindern kann.

4.2 Die Rolle der Zytoskelettelemente in der Thrombozytenmigration

In früheren Studien wurde nachgewiesen, dass die Zytoskelettelemente – Aktinfilamente, Myosin und Mikrotubuli – für die Übertragung und Verteilung der Adhäsions-, Kontraktions- und Retraktionskräfte über das Zytoplasma und die Zellmembran zuständig sind (Cohen, 1979). Durch die Übertragung dieser Kräfte helfen die Zytoskelettelemente bei der Aufrechterhaltung der Zellintegrität, bei dem Vorsprung und Fortbewegung der Zelle. In verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Zellarten wie Fibroblasten und Keratozyten konnte die Rolle der Zytoskelettelemente in der Zelladhäsion und -migration gezeigt werden (Barnhart et al., 2011, Danowski, 1989). Jedes Zytoskelettelement hat eine Teilfunktion in diesen Zellprozessen und kann nicht durch ein anderes ersetzt werden. Aus diesem Grund führt die Inhibierung eines dieser Zytoskelettelemente zu einer erheblichen Störung der Zelladhäsion und -migration sowie zu drastischen morphologischen Änderungen.

Myosin und Thrombozytenmigration

Myosin II bildet mit Aktinfilamenten die Zellkontraktionsmaschine (Adelstein et al., 1975) und wird von Phosphorylierung der MLC aktiviert, welche wiederum durch MLCK und Rho-Rock-Kaskade reguliert wird (Totsukawa et al., 2004). Es ist bekannt, dass Myosin II in mehreren verschiedenen zellulären Prozessen wie Zellkontraktion, Protrusion und Migration teilnimmt (Kureishi et al., 1997). Das aktivierte Myosin II bildet mit Aktinfilamenten die Aktinstressfasern (Calaminus et al., 2007), welche für die Erhaltung der zytoplasmatischen Kohärenz essenziell ist (Cai et al., 2010). Die direkte Inhibierung von Myosin II mittels Blebbistatin senkt die Affinität von Myosin II für Aktinfilamente (Allingham et al., 2005). In unseren Versuchen führte der Zusatz von Blebbistatin zu einer niedrigeren Migrationsrate bei unveränderter Adhäsionsrate (siehe Abbildung 13) und morphologischen Veränderungen der Thrombozyten (siehe Abbildung 14). Durch die Störung der Zellkontraktionsmaschine und Verhinderung der Reorganisation von Myosin und Aktinfilamenten können die Kontraktions-

und Retraktionskräfte nicht entstehen und nicht über die Zellmembran verteilt werden. Dadurch überwiegen die Adhäsionskräfte gegenüber den Migrationskräften und der Vorsprung an der Vorderkante sowie die Retraktion an der Hinterkante kann nicht stattfinden, was zur Bildung einer schmalen länglichen Form führt. Manche Thrombozyten bilden eine zentrale Lücke im Zytoplasma oder einer halbmondförmigen Form aus. Diese entstehen durch die fehlende regelmäßige Kraftverteilung (siehe Abbildung 14).

Die Inhibierung der Myosinaktivität mit Rock-Inhibitoren, welche die Aktivierung durch die Rho-Rock-Kaskade verhindern, verursacht auch morphologische Veränderungen (Bauer et al., 1999). Die Übertragung der Retraktionskräfte wird unterbrochen, deswegen kann die Retraktion an der Hinterkante der Thrombozyten nicht stattfinden, obwohl die Polarisierung an der Vorderkante zu einem gewissen Teil auftritt. Als Resultat entstehen Fenestrationsen im Zytoplasma der an der Oberfläche festklebenden Thrombozyten (siehe Abbildung 16). In früheren Studien wurde nachgewiesen, dass die RhoA-Inhibitoren Instabilität in der Thrombozyten-Interaktion sowie Thrombozyt-Matrix-Interaktion verursachen, die das Thrombuswachstum verhindert (Schoenwaelder et al., 2002). In unseren Versuchen mit Rock-Inhibitor konnte gesehen werden, dass sie im Vergleich zu mit Blebbistatin gemischten Thrombozyten mit der Migration zwar beginnen, aber nach einer gewissen Zeit aufhören. Die Migrationsrate in den Versuchen mit Rock-Inhibitoren im Vergleich zu Blebbistatin ist höher, weil Myosin II trotz der Inhibierung der Rho-Rock-Kaskade von MLCK aktiviert werden kann (siehe Abbildung 15).

Aktin und Thrombozytenmigration

In früheren Studien mit anderen Zelltypen konnten die verschiedenen Typen und Aufgaben der Aktinfilamente gezeigt werden. Die Aktinfasern befinden sich an der Zellvorderkante und verlängern sich in die Zellperipherie durch Polymerisation an ihren freien Enden. Sie bilden Aktinfilamente und durch deren Verbindung miteinander entstehen die Aktinbündel (Wegner, 1976). Dadurch verlängert sich das Zytoplasma in die Migrationsrichtung (Barnhart et al., 2011). Gleichzeitig verbinden sich die Aktinfilamente mit Myosinfasern, welche sich in der Zellmitte befinden und für die Retraktion der Hinterkante während der Migration zuständig sind (Pollard and Weihing, 1974, Cohen, 1979). Die Aktinstressfasern, die aus Aktinfilamenten, Myosinfasern und α -Aktinin entstehen, binden sich mit Aktin-bindenden-Proteinen an die Integrine (Small and Resch, 2005) und verstärken die Adhäsion zwischen Plasmamembran und extrazellulärer Matrix (Cooper, 2013). Außerdem leiten die Aktinstressfasern die Span-

nungen im Zellinneren, welche durch die Myosinkontraktion entstehen, an die Zelloberfläche (Clarke and Spudich, 1977).

In unseren Versuchsreihen mit Cytochalasin D, einem Inhibitor der Aktinpolymerisation, welcher an die freien (+)-Enden der Aktinfasern bindet (Harvey Lodish, 1996), kann beobachtet werden, dass in Anwesenheit von Cytochalasin D im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Migration mehr stattfindet (siehe Abbildung 17). Die adhärenen Thrombozyten bilden eine runde Form mit multiplen kleinen Ausläufern (siehe Abbildung 18). Gleichzeitig kann beobachtet werden, dass die frei zirkulierenden Thrombozyten nicht mehr an der Oberfläche adhären werden. Diese Ergebnisse unterstützen die bisherigen Erkenntnisse, dass die Aktinpolymerisation und Bildung von Aktinstressfasern mit Myosin für die Migration der Zelle essenziell sind. Ohne die Verlängerung der Aktinfilamente in Richtung der Migration kann der Vorsprung nicht stattfinden. Genauso ist eine Retraktion ohne Bildung des Aktin-Myosin-Netzwerkes nicht möglich. Die Wirkung von Cytochalasin D auf die Adhäsion hängt mit der Interaktion zwischen Aktinfilamenten und $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin zusammen. Aufgrund der Inaktivierung der Aktinpolymerisation wird kein Inside-out-signaling stimuliert und die Affinität des $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrins für Fibrinogen nimmt ab (Fox et al., 1996, Peerschke, 1984). Deswegen können die frei zirkulierenden Thrombozyten in Anwesenheit von Cytochalasin D nicht adhären werden.

Mikrotubulus und Thrombozytenmigration

Die Beteiligung der Mikrotubuli an der gerichteten Zellmigration bei Fibroblasten, Endothelzellen und Monozyten ist in früheren experimentellen Arbeiten erforscht worden. Die Mikrotubuli haben das Mikrotubulus-Organisationszentrum als stabile Starstelle in der Nähe der Nuklearmembran und wachsen in die Peripherie an ihrem (+)-Ende. Durch den simultanen Auf- und Abbau an ihren Enden besitzen sie eine dynamische Instabilität (Mitchison and Kirschner, 1984). Die nehmen an verschiedenen Zellprozessen teil, wie der Zellmigration (Goldman, 1971, Small et al., 2002), Zellteilung, Signaltransduktion, Absorbierung des mechanischen Stresses (Brangwynne et al., 2006), Zellverformung (Goldman et al., 2008) und Erhaltung sowie Wiederherstellung der Form nach Stimulation (White and Rao, 1998). Bei aktivierten Zellen findet sich eine Umstellung des Mikrotubulus-Reorganisationszentrums, welche für die Richtungsbestimmung während der gerichteten Migration notwendig ist (Gotlieb et al., 1983). Durch die Mikrotubuli wird eine Zellpolarität erzeugt, damit die Migrationskräfte für eine unidirektionale Lokomotion benutzt werden können (Vasiliev, 1991). Gleichzeitig helfen die Mikrotubuli bei dem Transport und der Freisetzung der Granulainhalte

an ihrer Vorderkante, welche die Fortbewegung in die Migrationsrichtung unterstützt (Kupfer et al., 1982). Die Depolymerisation mittels Spaltung der Mikrotubuli verstärkt die Bildung von Aktinstressfasern, welche wiederum die Zellkontraktion fördern (Chang and Wang, 2011, Verin et al., 2001). Zusätzlich können die Phosphorylierung und damit die Aktivitätsgrade der Myosinleichtketten von Mikrotubuli beeinflusst werden (Kolodney and Elson, 1995). Die Suppression der Dynamik mit Auf- und Abbau an den Plusenden führt zu mehr statischeren Mikrotubuli, die ihre Fähigkeit zur Zellverformung verlieren (Yang et al., 2010). Diese Ergebnisse aus früheren Studien mit unterschiedlichen Zellarten zeigen, dass die Mikrotubuli über verschiedene Wege und komplexe Verbindungen mit anderen Zytoskelettelementen die Zellmigration regulieren.

Das in unseren Versuchen eingesetzte Calyculin A, ein Protein-Phosphatase1/2A-Inhibitor, welcher die Reorganisation von Aktin und der Mikrotubuli hemmt, verursacht die Spaltung von Mikrotubulusbündeln in kleine Fragmente. Diese Fragmente verbinden sich miteinander oder mit Aktin und bilden lange parallel angeordnete Mikrotubuliketten. Aus diesen Mikrotubuliketten entstehen die langen Pseudopodien, die in Versuchsreihen mit Calyculin A in höherer Konzentration beobachtet werden (Yano et al., 1995). Gleichzeitig hemmt Calyculin A die MLCP, welche zu vermehrter Phosphorylierung der MLC führt und die Verbindung zwischen Aktin und Myosin verstärkt (Stark et al., 1991). Die erwartete vermehrte Migrationsrate sowie die erhöhte Geschwindigkeit konnten in unserer Versuchsreihe nicht beobachtet werden. Umgekehrt konnte beobachtet werden, dass die Geschwindigkeit sowie die Migrationsrate abnehmen, was durch die verminderte Freilegung der Fibrinogen-Rezeptoren bei aktivierten Thrombozyten bedingt ist (Sakon et al., 1993).

Die Thrombusformation ist ein dynamischer Prozess, in dem die Thrombozyten aktiviert werden und in einer bestimmten Richtung zur geschädigten Gefäßwand migrieren und durch die Verknüpfung miteinander einen stabilen Thrombus bilden. Es wurde in in-vivo Versuchen mit Mäusen nachgewiesen, dass die Thrombozyten sich aktiv entgegen der Richtung des Blutflusses in den Gefäßen bewegen können (Gaertner et al., 2017). Für die gezielte Migration bedürfen die Thrombozyten einer Reorganisation der Zytoskelettelemente, welche ein Netzwerk bilden, das die während des Migrationsprozesses entstehenden Kräfte über die Zellmembran verteilt. Durch die Verhinderung der Aktivierung von Myosin II, Aktin und Mikrotubulus, kombiniert oder getrennt, kann die Adhäsionsrate erniedrigt, die Migration verlangsamt und zum Teil komplett verhindert werden. Dadurch kann die überschüssige Bildung eines Thrombus gestoppt werden, was bei Patienten mit erhöhter Neigung zur Thrombusbildung wie zum

Beispiel bei koronaren Gefäßerkrankungen oder Gerinnungsstörungen als eine neue Therapieoption benutzt werden könnte.

4.3 Die Rolle von Serumbestandteilen in der Thrombozytenmigration

In in-vitro-Studien werden isolierte Thrombozyten mit Aktivatoren wie ADP und Thromboxan aktiviert. In die Versuchslösung addiertes Fibrinogen bindet sich an die Oberfläche und imitiert die extrazelluläre Matrix. In diesen Versuchen wird beobachtet, dass die Migration erst nach der Addition von Serum stattfinden kann. In Abwesenheit von Serum können die Thrombozyten trotz der Aktivierung und der Adhäsion an der extrazellulären Matrix nicht migrieren (siehe Abbildung 25). Das bedeutet, dass die Thrombozyten für die Migration bestimmte Serumbestandteile benötigen, die bisher noch nicht klar definiert sind.

Serumproteine und Thrombozytenmigration

Es gibt begrenzte Daten und Forschungsergebnisse zur Wirkung von Serumproteinen auf die Zellmigration. In wenigen Studien wurde nachgewiesen, dass Serumalbumin in der Zelladhäsion und -migration eine Rolle spielt (Mukherjee and Lynn, 1978) und für diese Wirkung als intaktes Protein benötigt wird (Ryser et al., 2009). Es ist auch bekannt, dass Albumin einen anti-adhäsiven Effekt hat und die Adhäsion durch Integrin-Fibrinogen-Verbindung entgegenwirken kann (Park et al., 1991), aber der genaue Wirkmechanismus konnte bis jetzt nicht geklärt werden. Andere Proteine wie Casein können den Effekt von Albumin auf die Migration eliminieren, wobei der Effekt von Albumin auf die Zelladhäsion unverändert bleibt (Valerius, 1983).

In unseren Versuchsreihen konnte beobachtet werden, dass ohne Serumproteine keine Migration stattfindet (siehe Abbildung 25) und die Wirkung von Albumin von anderen intakten Proteinen wie Casein und Ovalbumin ersetzt werden kann (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29). In den Versuchsreihen mit verdauten und zerstörten Proteinen wie Tryptocasein (siehe Abbildung 29) und Trypto-BSA (siehe Abbildung 30) tritt keine Migration auf, wobei die Adhäsion unbeeinträchtigt bleibt. Diese Befunde zeigen uns, dass die Thrombozyten für die Migration intakte Proteine benötigen. Die Migrationsrate und -geschwindigkeit der Thrombozyten ändern sich abhängig von Proteinkonzentrationen und sind annähernd identisch bei Versuchen mit Serum und Albumin 0,5%, was der Konzentration von Albumin im humanen Serum entspricht (siehe Abbildung 27). Die Ergebnisse aus unseren Versuchen beweisen die

essenzielle Rolle der Serumproteine in der Thrombozytenmigration. Wir vermuten, dass Albumin und andere Proteine durch den anti-adhäsiven Effekt die Migration ermöglichen können, welche in früheren Studien auch gezeigt wurde. Diese Vermutung kann mit unseren Ergebnissen unterstützt werden, weil mit zunehmender Albuminkonzentration ab 2% die Adhäsionsrate abnimmt (siehe Abbildung 26). Außerdem konnte festgestellt werden, dass Albumin alleine für die Migration nicht ausreichend ist und die Migration nur unter Kombination von Albumin mit Calcium stattfinden kann (siehe Abbildung 25). Albumin spielt nur eine Teilfunktion in dem Migrationsprozess, indem es die Adhäsivität von Fibrinogen senkt, sodass die Thrombozyten die ausreichende Kraft für die Calcium-modulierte-Retraktion an der Hinterkante entwickeln können. Der genaue Wirkmechanismus von diesem anti-adhäsiven Effekt bleibt weiterhin unklar und mag in weiteren Studien erforscht werden.

Serumionen und Thrombozytenmigration

Das Serum beinhaltet verschiedene Ionen, unter anderem Calcium und Magnesium. Die Rolle von Calciumionen bei der Migration von verschiedenen Zellarten wie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, glatten Muskelzellen und Neuronen ist bereits bekannt (Brundage et al., 1991, Yumura et al., 1996, Xu et al., 2004). Mittels Calcium-Einstroms durch die Calciumkanäle und Freisetzung aus den intrazellulären Speichern wird die Calciumkonzentration gesteigert. Insbesondere der Calcium-Einstrom ist mit der Zellmigration direkt gekoppelt. Es wurde beobachtet, dass bei Fibroblasten der Calcium-Einstrom durch Kanäle in der Plasmamembran mittels der Kopplung mit Calmodulin und MLCK die Phosphorylierung von MLC vermittelt, welche wiederum das Aktin-Myosin-Netzwerk aktiviert und die Retraktion an der Zellhinterkante ermöglicht (Yang and Huang, 2005). Bei migrierenden Zellen ist der größte Anteil von Calciumionen in der Zellhinterkante lokalisiert, weil sie die von Myosin II vermittelte Retraktion der Hinterkante stimulieren (Brundage et al., 1991, Xu et al., 2004, Hahn et al., 1992, Yumura et al., 1996). In den Versuchen mit glatten Muskelzellen wurde festgestellt, dass die Calciumkanäle gegenüber mechanischer Dehnung sensibel sind (Ruiz-Velasco et al., 1996). Durch die erhöhte Membranspannung während der Migration von Fishkeratozyten werden die Calciumkanäle geöffnet (Lee et al., 1999). Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration steigern die Kontraktionskräfte und vermindern die Adhäsionskräfte an der Zellhinterkante, sodass die Leukozyten sich vom Substrat lösen und migrieren können (Marks and Maxfield, 1990).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen führten wir Versuche durch mit dialysiertem Serum, bei dem die Serumbestandteile unter 2kDA unter anderem die Calciumionen mittels Dialyse-

membran herausfiltriert worden waren. Mit den Ergebnissen aus diesen Versuchen können wir bestätigen, dass der Calciueinstrom aus extrazellulärem Serum für die Thrombozytenmigration essenziell ist, weil die Migrationsrate nach der Zugabe von Calciumionen in das dialysierte Serum einen deutlichen Anstieg zeigt (siehe Abbildung 21). Die trotz der Dialyse bestehende Restmigration wird möglicherweise durch die Calciumionen, die aus den intrazellulären Speichern freigesetzt werden, ausgelöst.

In früheren Experimenten mit Calcium und Magnesium konnte herausgefunden werden, dass beide Ionen mit CIB1 Verbindungen herstellen können, welche die Affinität von CIB1 für $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine steigern (Yamniuk and Vogel, 2005). Die von CIB1 aktivierten $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine haben eine höhere Affinität für ihren Liganden Fibrinogen und vWF, welche die Adhäsion verstärkt (Tsuboi, 2002). Die Affinität der $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine zu ihren Liganden kann auch mittels direkter Interaktion zwischen Integrin und divalenten Kationen wie Magnesium und Calcium gesteigert werden (Hu et al., 1996). Die Versuche mit Magnesium zeigen uns wie erwartet, dass die Adhäsion ungestört stattfinden kann und eine Migration mit Magnesium möglich ist (siehe Abbildung 23).

Die Migrationsrate sowie die Migrationsgeschwindigkeit in den Versuchen mit Magnesium im Vergleich zu Calcium liegen deutlich niedriger und steigen unter Addition von Calcium (siehe Abbildung 24). Die Aktivierung der Zytoskelettelemente durch Calcium über Calmodulin und MLCK-Kaskade spielt vermutlich den im Vordergrund stehenden Effekt in der ansteigenden Migrationsrate und –Geschwindigkeit. In den Versuchen mit Mangan konnte keine Migration beobachtet werden (siehe Abbildung 24). Mangan führt zur direkten Stabilisierung der aktiven Integrinkonformation (Smith et al., 1994). Somit steigt die Affinität von $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine an ihren Liganden und Adhäsionskraft der Thrombozyten nimmt zu, sodass die Thrombozyten an der Oberfläche anheften.

Diese Ergebnisse zeigen die zentrale Rolle von Calcium in der Thrombozytenmigration auf, die durch die anderen Ionen nicht adäquat ersetzt werden kann (siehe Abbildung 24). Alle drei Ionen haben einen Einfluss auf die Aktivität von $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrin, aber Calcium kann zusätzlich die Aktivität der Zytoskelettelemente steuern, sodass die für die Migration benötigte Protrusion- und Retraktionskräfte gebildet werden können. Nach unseren Versuchen können wir Calcium und Albumin als für die Migration essenzielle Serumbestandteile identifizieren, deren Wirkung von anderen Proteinen und Ionen nur zum Teil ersetzt werden kann. Die Thrombozytenmigration wird durch die von Calcium erhöhte Kontraktilität an der Zellhinterkante und die von Albumin gesenkte Adhäsivität ermöglicht. Die verschiedenen Wirkmecha-

nismen von Calcium konnten in früheren Studien identifiziert und mit unseren Versuchen bestätigt werden, der Einflussweg von Albumin und anderen Proteinen auf die Thrombozytenmigration bedarf jedoch weiterer Erforschung.

Durch diese Arbeit konnte neue Kenntnisse in der Thrombozytenmigration gesammelt werden. Die Thrombozyten können nach der Aktivierung an die Oberfläche anheften und mittels Reorganisation der Zytoskelettelemente –Aktin und Myosin– sich polarisieren. Dadurch können die Thrombozyten die Adhäsions- und Migrationskräfte im Zellinnere verteilen und ihre Integrität behalten. Die Thrombozytenmigration kann in Abwesenheit von Serum nicht stattfinden. Die essentiellen Serumbestandteile für die Thrombozytenmigration sind Albumin und Calcium, deren Aufgabe von anderen Proteinen und Ionen nicht adäquat ersetzt werden kann. Die antiadhäsive Wirkung von Albumin und proadhäsive Wirkung von Fibrinogen bilden ein Gleichgewicht. Die komplexen Interaktionen zwischen Integrine, Calciumkanäle, Liganden und Zytoskelettelemente regulieren die Thrombozytenmigration. Durch Calciumionen findet die Aktivierung der Zytoskelettelemente statt, welche die durch Aktin vermittelte Protrusion an der Zellvorderkante und von Myosin vermittelte Retraktion an der Hinterkante und damit die Fortbewegung der Thrombozyten ermöglichen. Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen in in-vitro-Versuchsbedingung verschiedene Regulationsmechanismen der Thrombozytenmigration und mögliche Inhibitoren zur kompletten Verhinderung oder zur Verlangsamung der Thrombozytenmigration sowie zur kontrollierten Reduktion der Migrationsrate. Für die Beobachtung und Analyse von Einfluss dieser Wirkstoffe in physiologischen Bedingungen sollen weitere in-vivo-Versuche durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Hintergrund Die Thrombozyten sind wichtige Bestandteile der Hämostase und Thrombusbildung. Nach einer Verletzung an der Gefäßwand werden sie von verschiedenen freigesetzten Mediatoren aktiviert. Die aktivierten Thrombozyten bewegen sich zu dem verletzten Areal und bilden dort zusammen mit anderen Thrombozyten und extrazellulären Matrixproteinen den stabilen Thrombus. Für die Adhäsion an die Gefäßwand sowie für die gezielte Migration benötigen die Thrombozyten die Verbindung zwischen ihren Rezeptoren und der extrazellulären Matrix, die Reorganisation der Zytoskelettelemente sowie bestimmte Serumbestandteile. Die Thrombusformation ist für die Blutstillung essenziell, aber eine überschüssige Aktivität von Thrombozyten kann auch Probleme wie eine Thromboseneigung oder Gefäßverschlüsse verursachen. Frühere Studien konnten zeigen, dass die Zytoskelettelemente bei der Migration verschiedener Zelltypen eine Rolle spielen. Deren Wirkung auf die Thrombozytenmigration wurde bis jetzt zum Teil erforscht. Es ist bekannt, dass viele Zelltypen für die Migration Serumionen, insbesondere Calcium, benötigen. Die für die Thrombozytenmigration essenziellen Serumbestandteile sind jedoch in bisherigen Studien nicht genau identifiziert worden.

Ergebnisse Eine Migration findet in der Abwesenheit von Serum nicht statt. Die Versuche mit dialysiertem Serum beweisen, dass die Calciumionen für die Migration essenziell sind. Als weiterer Serumbestandteil, der für die Thrombozytenmigration entscheidend ist, kann Albumin identifiziert werden. Die Migration findet nur unter Kombination von beiden statt und eine Zerstörung der Zusammensetzung des Albumins mit Trypsin führt zu einem Verlust von dessen Funktion. Andere Serumionen oder Proteine können die Funktion von Albumin und Calcium nur teilweise übernehmen, weil vor allem Calcium im Vergleich zu den anderen Ionen die Migration über Aktivierung der Zytoskelettelemente steuern kann. Die Thrombozytenmigration ist ein dynamischer Prozess und benötigt die Reorganisation und Aktivierung der Zytoskelettelemente, welche die gezielte und unidirektionale Migration durch die Verteilung der Adhäsions- und Migrationskräfte ermöglichen und gleichzeitig die Integrität der Zellmembran bewahren. Die Migrationsrate und -geschwindigkeit nehmen durch Inhibition

von Zytoskelettelementen – Aktin, Myosin und Mikrotubuli – ab und die spezielle Form und Polarität der Zellen können nicht ausgebildet werden, was zur drastischen Formveränderungen mit Bildung von Pseudopodien und Fenestrationsen führt. Die komplexen Verkopplungen zwischen $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrinen, Liganden, Calciumkanälen und Zytoskelettelementen spielen eine entscheidende Rolle bei der Thrombozytenmigration. Diese Verkopplungen ermöglichen die Eröffnung der Calciumkanäle, erhöhen die Affinität der $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -Integrine für Fibrinogen, regulieren die Adhäsivität, erzeugen die Bildung des Aktin-Myosin-Netzwerkes und leiten die Kräfte aus dem Zellinneren an die Zellmembran weiter, wodurch die Protrusion an der Vorderkante und Retraktion an der Hinterkante und somit die Migration stattfindet.

Schlussfolgerung Eine unidirektionale, gezielte Migration wird für die Thrombusbildung an der geschädigten Gefäßwand benötigt, welche durch die komplexe Zusammenarbeit von Serumbestandteilen, Membranrezeptoren und Zytoskelettelementen reguliert wird. Eine Thromboseneigung und Gefäßverschlüsse als Folgen einer überschüssigen Thrombozytenaktivität können mittels kontrollierter Inhibition dieser Mechanismen verhindert werden.

Literaturverzeichnis

- ABRAMOWITZ, M. & DAVIDSON, M. W. 2012. *Microscopy resource center* [Online]. Available: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/dic/dicoverview.html>.
- ADELSTEIN, R. S. & CONTI, M. A. 1975. Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity. *Nature*, 256, 597-8.
- ADELSTEIN, R. S., CONTI, M. A., DANIEL, J. L. & ANDERSON, W., JR. 1975. The interaction of platelet actin, myosin and myosin light chain kinase. *Ciba Found Symp*, 35, 101-9.
- ALLINGHAM, J. S., SMITH, R. & RAYMENT, I. 2005. The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 378-9.
- BALABAN, N. Q., SCHWARZ, U. S., RIVELINE, D., GOICHBERG, P., TZUR, G., SABANAY, I., MAHALU, D., SAFRAN, S., BERSHADSKY, A., ADDADI, L. & GEIGER, B. 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, 3, 466-72.
- BARNHART, E. L., LEE, K. C., KEREN, K., MOGILNER, A. & THERIOT, J. A. 2011. An adhesion-dependent switch between mechanisms that determine motile cell shape. *PLoS Biol*, 9, e1001059.
- BAUER, J. S., SCHREINER, C. L., GIANCOTTI, F. G., RUOSLAHTI, E. & JULIANO, R. L. 1992. Motility of fibronectin receptor-deficient cells on fibronectin and vitronectin: collaborative interactions among integrins. *J Cell Biol*, 116, 477-87.
- BAUER, M., RETZER, M., WILDE, J. I., MASCHBERGER, P., ESSLER, M., AEPFELBACHER, M., WATSON, S. P. & SIESS, W. 1999. Dichotomous regulation of myosin phosphorylation and shape change by Rho-kinase and calcium in intact human platelets. *Blood*, 94, 1665-72.
- BENNETT, J. S., ZIGMOND, S., VILAIRE, G., CUNNINGHAM, M. E. & BEDNAR, B. 1999. The platelet cytoskeleton regulates the affinity of the integrin $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ for fibrinogen. *J Biol Chem*, 274, 25301-7.

- BERRIDGE, M. J., BOOTMAN, M. D. & RODERICK, H. L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 517-29.
- BORISY, G. G. & TAYLOR, E. W. 1967. The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-3H to cellular protein. *J Cell Biol*, 34, 525-33.
- BRANGWYNNE, C. P., MACKINTOSH, F. C., KUMAR, S., GEISSE, N. A., TALBOT, J., MAHADEVAN, L., PARKER, K. K., INGBER, D. E. & WEITZ, D. A. 2006. Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J Cell Biol*, 173, 733-41.
- BRUNDAGE, R. A., FOGARTY, K. E., TUFT, R. A. & FAY, F. S. 1991. Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science*, 254, 703-6.
- BURGER, W. & BURGE, M. J. 2006. *Digitale Bildverarbeitung - Eine Einführung mit Java und ImageJ*, Berlin, Heidelberg, Springer
- CAI, Y., ROSSIER, O., GAUTHIER, N. C., BIAIS, N., FARDIN, M. A., ZHANG, X., MILLER, L. W., LADOUX, B., CORNISH, V. W. & SHEETZ, M. P. 2010. Cytoskeletal coherence requires myosin-IIA contractility. *J Cell Sci*, 123, 413-23.
- CALAMINUS, S. D., AUGER, J. M., MCCARTY, O. J., WAKELAM, M. J., MACHESKY, L. M. & WATSON, S. P. 2007. MyosinIIa contractility is required for maintenance of platelet structure during spreading on collagen and contributes to thrombus stability. *J Thromb Haemost*, 5, 2136-45.
- CANOBBIO, I., NORIS, P., PECCI, A., BALDUINI, A., BALDUINI, C. L. & TORTI, M. 2005. Altered cytoskeleton organization in platelets from patients with MYH9-related disease. *J Thromb Haemost*, 3, 1026-35.
- CATTERALL, W. A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16, 521-55.
- CHANG, H.-I. & WANG, Y. 2011. Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds. In: EBERLI, D. P. (ed.) *Regenerative Medicine and Tissue Engineering - Cells and Biomaterials*. In Tech.
- CHANG, Y., AURADE, F., LARBRET, F., ZHANG, Y., LE COUEDIC, J. P., MOMEUX, L., LARGHERO, J., BERTOGLIO, J., LOUACHE, F., CRAMER, E.,

- VAINCHENKER, W. & DEBILI, N. 2007. Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway. *Blood*, 109, 4229-36.
- CHANG, Y. C., NALBANT, P., BIRKENFELD, J., CHANG, Z. F. & BOKOCH, G. M. 2008. GEF-H1 couples nocodazole-induced microtubule disassembly to cell contractility via RhoA. *Mol Biol Cell*, 19, 2147-53.
- CHOU, J., MACKMAN, N., MERRILL-SKOLOFF, G., PEDERSEN, B., FURIE, B. C. & FURIE, B. 2004. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood*, 104, 3190-7.
- CLARKE, M. & SPUDICH, J. A. 1977. Nonmuscle contractile proteins: the role of actin and myosin in cell motility and shape determination. *Annu Rev Biochem*, 46, 797-822.
- CLEMETSON, K. J. & CLEMETSON, J. M. 2007. Collagen receptors as potential targets for novel anti-platelet agents. *Curr Pharm Des*, 13, 2673-83.
- COHEN, I. 1979. The contractile system of blood platelets and its function. *Methods Achiev Exp Pathol*, 9, 40-86.
- COOPER, G. M. 2013. *The Cell: A Molecular Approach*, Sunderland (MA), Sinauer Associates.
- CRAWLEY, J. T., ZANARDELLI, S., CHION, C. K. & LANE, D. A. 2007. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost*, 5 Suppl 1, 95-101.
- CZAPIGA, M., KIRK, A. D. & LEKSTROM-HIMES, J. 2004. Platelets deliver costimulatory signals to antigen-presenting cells: a potential bridge between injury and immune activation. *Exp Hematol*, 32, 135-9.
- DANIEL, J. L., MOLISH, I. R., RIGMAIDEN, M. & STEWART, G. 1984. Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response. *J Biol Chem*, 259, 9826-31.
- DANOWSKI, B. A. 1989. Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J Cell Sci*, 93 (Pt 2), 255-66.
- DIMILLA, P. A., BARBEE, K. & LAUFFENBURGER, D. A. 1991. Mathematical model for the effects of adhesion and mechanics on cell migration speed. *Biophys J*, 60, 15-37.

- DIMILLA, P. A., STONE, J. A., QUINN, J. A., ALBELDA, S. M. & LAUFFENBURGER, D. A. 1993. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol*, 122, 729-37.
- FLAUMENHAFT, R. 2003. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 1152-60.
- FOX, J. E., SHATTIL, S. J., KINLOUGH-RATHBONE, R. L., RICHARDSON, M., PACKHAM, M. A. & SANAN, D. A. 1996. The platelet cytoskeleton stabilizes the interaction between $\alpha\text{IIb}\beta_3$ and its ligand and induces selective movements of ligand-occupied integrin. *J Biol Chem*, 271, 7004-11.
- GACHET, C. 2008. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost*, 99, 466-72.
- GAERTNER, F., AHMAD, Z., ROSENBERGER, G., FAN, S., NICOLAI, L., BUSCH, B., YAVUZ, G., LUCKNER, M., ISHIKAWA-ANKERHOLD, H., HENNEL, R., BENECHET, A., LORENZ, M., CHANDRARATNE, S., SCHUBERT, I., HELMER, S., STRIEDNIG, B., STARK, K., JANKO, M., BOTTCHER, R. T., VERSCHOOR, A., LEON, C., GACHET, C., GUDERMANN, T., MEDEROS, Y. S. M., PINCUS, Z., IANNAcone, M., HAAS, R., WANNER, G., LAUBER, K., SIXT, M. & MASSBERG, S. 2017. Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria. *Cell*, 171, 1368-1382 e23.
- GÄRTNER, F. 2012. *Die funktionelle Bedeutung der thrombozytaeren Sphingosinkinase 1 und 2 in der arteriellen Thrombose*. Promotion, Technische Universität München.
- GOLDMAN, R. D. 1971. The role of three cytoplasmic fibers in BHK-21 cell motility. I. Microtubules and the effects of colchicine. *J Cell Biol*, 51, 752-62.
- GOLDMAN, R. D., GRIN, B., MENDEZ, M. G. & KUCZMARSKI, E. R. 2008. Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 28-34.
- GORBET, M. B. & SEFTON, M. V. 2004. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*, 25, 5681-703.

- GOTLIEB, A. I., SUBRAHMANYAN, L. & KALNINS, V. I. 1983. Microtubule-organizing centers and cell migration: effect of inhibition of migration and microtubule disruption in endothelial cells. *J Cell Biol*, 96, 1266-72.
- GRZESIAK, J. J., DAVIS, G. E., KIRCHHOFER, D. & PIERSCHBACHER, M. D. 1992. Regulation of alpha 2 beta 1-mediated fibroblast migration on type I collagen by shifts in the concentrations of extracellular Mg²⁺ and Ca²⁺. *J Cell Biol*, 117, 1109-17.
- GUNDERSEN, G. G. & BULINSKI, J. C. 1988. Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 5946-50.
- GUPTON, S. L. & WATERMAN-STORER, C. M. 2006. Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell*, 125, 1361-74.
- HAHN, K., DEBIASIO, R. & TAYLOR, D. L. 1992. Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells. *Nature*, 359, 736-8.
- HALL, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279, 509-14.
- HARTWIG, J. H. & DESISTO, M. 1991. The cytoskeleton of the resting human blood platelet: structure of the membrane skeleton and its attachment to actin filaments. *J Cell Biol*, 112, 407-25.
- HARVEY LODISH, D. B., ARNOLD BERK, S. LAWRENCE ZIPURSKY, PAUL MATSUDAIRA, JAMES DARNELL 1996. *Molekulare Zellbiologie*, New York, Walter de Gruyter & Co.
- HELLSTROM, S. L. 2007. Basic Models of Spin Coating. Stanford University.
- HU, D. D., BARBAS, C. F. & SMITH, J. W. 1996. An allosteric Ca²⁺ binding site on the beta3-integrins that regulates the dissociation rate for RGD ligands. *J Biol Chem*, 271, 21745-51.
- HUANG, H., ISHIDA, H., YAMNIUK, A. P. & VOGEL, H. J. 2011. Solution structures of Ca²⁺-CIB1 and Mg²⁺-CIB1 and their interactions with the platelet integrin alphaIIb cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 286, 17181-92.

- HUANG, H. & VOGEL, H. J. 2012. Structural basis for the activation of platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ by calcium- and integrin-binding protein 1. *J Am Chem Soc*, 134, 3864-72.
- HUTTENLOCHER, A., GINSBERG, M. H. & HORWITZ, A. F. 1996. Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J Cell Biol*, 134, 1551-62.
- HWANG, D. L., YEN, C. F. & NADLER, J. L. 1992. Effect of extracellular magnesium on platelet activation and intracellular calcium mobilization. *Am J Hypertens*, 5, 700-6.
- HYNES, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.
- INVESTIGATORS, E. 1994. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med*, 330, 956-61.
- ITALIANO, J. E., JR., PATEL-HETT, S. & HARTWIG, J. H. 2007. Mechanics of proplatelet elaboration. *J Thromb Haemost*, 5 Suppl 1, 18-23.
- JORDAN, M. A. & WILSON, L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer*, 4, 253-65.
- JUNT, T., SCHULZE, H., CHEN, Z., MASSBERG, S., GOERGE, T., KRUEGER, A., WAGNER, D. D., GRAF, T., ITALIANO, J. E., JR., SHIVDASANI, R. A. & VON ANDRIAN, U. H. 2007. Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow. *Science*, 317, 1767-70.
- KASIRER-FRIEDE, A., COZZI, M. R., MAZZUCATO, M., DE MARCO, L., RUGGERI, Z. M. & SHATTIL, S. J. 2004. Signaling through GP Ib-IX-V activates $\alpha\text{IIb}\beta 3$ independently of other receptors. *Blood*, 103, 3403-11.
- KNEZEVIC, I., LEISNER, T. M. & LAM, S. C. 1996. Direct binding of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (GPIIb-IIIa) to talin. Evidence that interaction is mediated through the cytoplasmic domains of both αIIb and $\beta 3$. *J Biol Chem*, 271, 16416-21.

- KOLODNEY, M. S. & ELSON, E. L. 1995. Contraction due to microtubule disruption is associated with increased phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 10252-6.
- KOMURO, H. & RAKIC, P. 1993. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science*, 260, 95-7.
- KRAEMER, B. F., BORST, O., GEHRING, E. M., SCHOENBERGER, T., URBAN, B., NINCI, E., SEIZER, P., SCHMIDT, C., BIGALKE, B., KOCH, M., MARTINOVIC, I., DAUB, K., MERZ, T., SCHWANITZ, L., STELLOS, K., FIESEL, F., SCHALLER, M., LANG, F., GAWAZ, M. & LINDEMANN, S. 2010. PI3 kinase-dependent stimulation of platelet migration by stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Mol Med (Berl)*, 88, 1277-88.
- KRAEMER, B. F., SCHMIDT, C., URBAN, B., BIGALKE, B., SCHWANITZ, L., KOCH, M., SEIZER, P., SCHALLER, M., GAWAZ, M. & LINDEMANN, S. 2011. High shear flow induces migration of adherent human platelets. *Platelets*, 22, 415-21.
- KUPFER, A., LOUVARD, D. & SINGER, S. J. 1982. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 2603-7.
- KUREISHI, Y., KOBAYASHI, S., AMANO, M., KIMURA, K., KANAIDE, H., NAKANO, T., KAIBUCHI, K. & ITO, M. 1997. Rho-associated kinase directly induces smooth muscle contraction through myosin light chain phosphorylation. *J Biol Chem*, 272, 12257-60.
- LACHMANN, P. J. 2010. Preparing serum for functional complement assays. *J Immunol Methods*, 352, 195-7.
- LAM, S. C., PLOW, E. F., SMITH, M. A., ANDRIEUX, A., RYCKWAERT, J. J., MARGUERIE, G. & GINSBERG, M. H. 1987. Evidence that arginyl-glycyl-aspartate peptides and fibrinogen gamma chain peptides share a common binding site on platelets. *J Biol Chem*, 262, 947-50.
- LAUFFENBURGER, D. A. & HORWITZ, A. F. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84, 359-69.

- LEE, J., ISHIHARA, A., OXFORD, G., JOHNSON, B. & JACOBSON, K. 1999. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature*, 400, 382-6.
- LENG, L., KASHIWAGI, H., REN, X. D. & SHATTIL, S. J. 1998. RhoA and the function of platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$. *Blood*, 91, 4206-15.
- LEON, C., ECKLY, A., HECHLER, B., ALEIL, B., FREUND, M., RAVANAT, C., JOURDAIN, M., NONNE, C., WEBER, J., TIEDT, R., GRATACAP, M. P., SEVERIN, S., CAZENAVE, J. P., LANZA, F., SKODA, R. & GACHET, C. 2007. Megakaryocyte-restricted MYH9 inactivation dramatically affects hemostasis while preserving platelet aggregation and secretion. *Blood*, 110, 3183-91.
- LI, Z., DELANEY, M. K., O'BRIEN, K. A. & DU, X. 2010. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 2341-9.
- LOWENHAUPT, R. W. 1978. Human platelet chemotaxis: requirement for plasma factor(s) and the role of collagen. *Am J Physiol*, 235, H23-8.
- MALECH, H. L., ROOT, R. K. & GALLIN, J. I. 1977. Structural analysis of human neutrophil migration. Centriole, microtubule, and microfilament orientation and function during chemotaxis. *J Cell Biol*, 75, 666-93.
- MARGUERIE, G. A., PLOW, E. F. & EDGINGTON, T. S. 1979. Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J Biol Chem*, 254, 5357-63.
- MARKS, P. W. & MAXFIELD, F. R. 1990. Transient increases in cytosolic free calcium appear to be required for the migration of adherent human neutrophils. *J Cell Biol*, 110, 43-52.
- MASSBERG, S., GAWAZ, M., GRUNER, S., SCHULTE, V., KONRAD, I., ZOHLNHOFFER, D., HEINZMANN, U. & NIESWANDT, B. 2003. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med*, 197, 41-9.
- MASSBERG, S., SCHURZINGER, K., LORENZ, M., KONRAD, I., SCHULZ, C., PLESNILA, N., KENNERKNECHT, E., RUDELIUS, M., SAUER, S., BRAUN, S., KREMMER, E., EMAMBOKUS, N. R., FRAMPTON, J. & GAWAZ, M. 2005.

- Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation*, 112, 1180-8.
- MAUPIN, P., PHILLIPS, C. L., ADELSTEIN, R. S. & POLLARD, T. D. 1994. Differential localization of myosin-II isozymes in human cultured cells and blood cells. *J Cell Sci*, 107 (Pt 11), 3077-90.
- MICHAELIS, S., ROBELEK, R. & WEGENER, J. 2012. Studying cell-surface interactions in vitro: a survey of experimental approaches and techniques. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 126, 33-66.
- MITCHISON, T. & KIRSCHNER, M. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312, 237-42.
- MOHRI, H. & OHKUBO, T. 1993. The role of the RGD peptides and the gamma chain peptide of fibrinogen on fibrinogen binding to activated platelets. *Peptides*, 14, 353-7.
- MUKHERJEE, C. & LYNN, W. S. 1978. Role of ions and extracellular protein in leukocyte motility and membrane ruffling. *Am J Pathol*, 93, 369-81.
- NEBL, T. & FISHER, P. R. 1997. Intracellular Ca²⁺ signals in Dictyostelium chemotaxis are mediated exclusively by Ca²⁺ influx. *J Cell Sci*, 110 (Pt 22), 2845-53.
- O'TOOLE, T. E., KATAGIRI, Y., FAULL, R. J., PETER, K., TAMURA, R., QUARANTA, V., LOFTUS, J. C., SHATTIL, S. J. & GINSBERG, M. H. 1994. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol*, 124, 1047-59.
- OFFERMANN, S. 2006. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*, 99, 1293-304.
- ONO, A., WESTEIN, E., HSIAO, S., NESBITT, W. S., HAMILTON, J. R., SCHOENWAEELDER, S. M. & JACKSON, S. P. 2008. Identification of a fibrin-independent platelet contractile mechanism regulating primary hemostasis and thrombus growth. *Blood*, 112, 90-9.
- PALECEK, S. P., LOFTUS, J. C., GINSBERG, M. H., LAUFFENBURGER, D. A. & HORWITZ, A. F. 1997. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature*, 385, 537-40.

- PARISE, L. V. & PHILLIPS, D. R. 1985. Reconstitution of the purified platelet fibrinogen receptor. Fibrinogen binding properties of the glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem*, 260, 10698-707.
- PARK, K., MAO, F. W. & PARK, H. 1991. The minimum surface fibrinogen concentration necessary for platelet activation on dimethyldichlorosilane-coated glass. *J Biomed Mater Res*, 25, 407-20.
- PEERSCHKE, E. I. 1984. Observations on the effects of cytochalasin B and cytochalasin D on ADP- and chymotrypsin-treated platelets. *Proc Soc Exp Biol Med*, 175, 109-15.
- PEERSCHKE, E. I. & GALANAKIS, D. K. 1987. The synthetic RGDS peptide inhibits the binding of fibrinogen lacking intact alpha chain carboxyterminal sequences to human blood platelets. *Blood*, 69, 950-2.
- PITCHFORD, S. C., MOMI, S., BAGLIONI, S., CASALI, L., GIANNINI, S., ROSSI, R., PAGE, C. P. & GRESELE, P. 2008. Allergen induces the migration of platelets to lung tissue in allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 177, 604-12.
- PLOW, E. F., HAAS, T. A., ZHANG, L., LOFTUS, J. & SMITH, J. W. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*, 275, 21785-8.
- POLLARD, T. D. 1981. Cytoplasmic contractile proteins. *J Cell Biol*, 91, 156s-165s.
- POLLARD, T. D. & WEIHING, R. R. 1974. Actin and myosin and cell movement. *CRC Crit Rev Biochem*, 2, 1-65.
- POURROY, B., HONORE, S., PASQUIER, E., BOURGAREL-REY, V., KRUCZYNSKI, A., BRIAND, C. & BRAGUER, D. 2006. Antiangiogenic concentrations of vinflunine increase the interphase microtubule dynamics and decrease the motility of endothelial cells. *Cancer Res*, 66, 3256-63.
- PYTELA, R., PIERSCHBACHER, M. D., GINSBERG, M. H., PLOW, E. F. & RUOSLAHTI, E. 1986. Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp--specific adhesion receptors. *Science*, 231, 1559-62.
- QUINN, M. J., BYZOVA, T. V., QIN, J., TOPOL, E. J. & PLOW, E. F. 2003. Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and its antagonism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23, 945-52.

- RAUCHER, D. & SHEETZ, M. P. 2000. Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol*, 148, 127-36.
- RUGGERI, Z. M. 1997. Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost*, 78, 611-6.
- RUGGERI, Z. M., HOUGHTEN, R. A., RUSSELL, S. R. & ZIMMERMAN, T. S. 1986. Inhibition of platelet function with synthetic peptides designed to be high-affinity antagonists of fibrinogen binding to platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 5708-12.
- RUIZ-VELASCO, V., MAYER, M. B. & HYMEL, L. J. 1996. Dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} influx modulated by stretch in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, 296, 327-34.
- RYSER, M. F., THIEME, S., BORNHAUSER, M., LEHMANN, R. & BRENNER, S. 2009. Serum albumin strongly influences SDF-1 dependent migration. *Int J Hematol*, 89, 269-75.
- SAKON, M., MURATA, K., FUJITANI, K., YANO, Y., KAMBAYASHI, J., UEMURA, Y., KAWASAKI, T., SHIBA, E. & MORI, T. 1993. Calyculin A inhibits the exposure of fibrinogen receptor in thrombin-stimulated platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, 195, 139-43.
- SAMUELSSON, B., GOLDYNE, M., GRANSTROM, E., HAMBERG, M., HAMMARSTROM, S. & MALMSTEN, C. 1978. Prostaglandins and thromboxanes. *Annu Rev Biochem*, 47, 997-1029.
- SAVAGE, B., SALDIVAR, E. & RUGGERI, Z. M. 1996. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell*, 84, 289-97.
- SCHMIDT, D. R., WALDECK, H. & KAO, W. J. 2000. *Protein adsorption to Biomaterials*, Springer US.
- SCHMIDT, E. M., KRAEMER, B. F., BORST, O., MUNZER, P., SCHONBERGER, T., SCHMIDT, C., LEIBROCK, C., TOWHID, S. T., SEIZER, P., KUHLE, D., STOURNARAS, C., LINDEMANN, S., GAWAZ, M. & LANG, F. 2012. SGK1 sensitivity of platelet migration. *Cell Physiol Biochem*, 30, 259-68.

- SCHMIDT, E. M., MUNZER, P., BORST, O., KRAEMER, B. F., SCHMID, E., URBAN, B., LINDEMANN, S., RUTH, P., GAWAZ, M. & LANG, F. 2011. Ion channels in the regulation of platelet migration. *Biochem Biophys Res Commun*, 415, 54-60.
- SCHOENWAEELDER, S. M., HUGHAN, S. C., BONIFACE, K., FERNANDO, S., HOLDSWORTH, M., THOMPSON, P. E., SALEM, H. H. & JACKSON, S. P. 2002. RhoA sustains integrin alpha IIb beta 3 adhesion contacts under high shear. *J Biol Chem*, 277, 14738-46.
- SCHWARTZ, E. L. 2009. Antivascular actions of microtubule-binding drugs. *Clin Cancer Res*, 15, 2594-601.
- SERI, M., CUSANO, R., GANGAROSSA, S., CARIDI, G., BORDO, D., LO NIGRO, C., GHIGGERI, G. M., RAVAZZOLO, R., SAVINO, M., DEL VECCHIO, M., D'APOLITO, M., IOLASCON, A., ZELANTE, L. L., SAVOIA, A., BALDUINI, C. L., NORIS, P., MAGRINI, U., BELLETTI, S., HEATH, K. E., BABCOCK, M., GLUCKSMAN, M. J., ALIPRANDIS, E., BIZZARO, N., DESNICK, R. J. & MARTIGNETTI, J. A. 2000. Mutations in MYH9 result in the May-Hegglin anomaly, and Fechtner and Sebastian syndromes. The May-Hegglin/Fechtner Syndrome Consortium. *Nat Genet*, 26, 103-5.
- SHATTIL, S. J. & NEWMAN, P. J. 2004. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood*, 104, 1606-15.
- SHEN, Y., WANG, G., HUANG, X., ZHANG, Q., WU, J., TANG, C., YU, Q. & LIU, X. 2012. Surface wettability of plasma SiOx:H nanocoating-induced endothelial cells' migration and the associated FAK-Rho GTPases signalling pathways. *J R Soc Interface*, 9, 313-27.
- SINGER, S. J. & KUPFER, A. 1986. The directed migration of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Biol*, 2, 337-65.
- SMALL, J. V., GEIGER, B., KAVERINA, I. & BERSHADSKY, A. 2002. How do microtubules guide migrating cells? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 957-64.
- SMALL, J. V. & RESCH, G. P. 2005. The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 517-23.

- SMITH, J. W., PIOTROWICZ, R. S. & MATHIS, D. 1994. A mechanism for divalent cation regulation of beta 3-integrins. *J Biol Chem*, 269, 960-7.
- STARK, F., GOLLA, R. & NACHMIAS, V. T. 1991. Formation and contraction of a microfilamentous shell in saponin-permeabilized platelets. *J Cell Biol*, 112, 903-13.
- STENBERG, P. E. & LEVIN, J. 1989. Mechanisms of platelet production. *Blood Cells*, 15, 23-47.
- TCHENG, J. E., KANDZARI, D. E., GRINES, C. L., COX, D. A., EFFRON, M. B., GARCIA, E., GRIFFIN, J. J., GUAGLIUMI, G., STUCKEY, T., TURCO, M., FAHY, M., LANSKY, A. J., MEHRAN, R., STONE, G. W. & INVESTIGATORS, C. 2003. Benefits and risks of abciximab use in primary angioplasty for acute myocardial infarction: the Controlled Abciximab and Device Investigation to Lower Late Angioplasty Complications (CADILLAC) trial. *Circulation*, 108, 1316-23.
- TOTSUKAWA, G., WU, Y., SASAKI, Y., HARTSHORNE, D. J., YAMAKITA, Y., YAMASHIRO, S. & MATSUMURA, F. 2004. Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts. *J Cell Biol*, 164, 427-39.
- TOWBIN, H., STAEGELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- TSUBOI, S. 2002. Calcium integrin-binding protein activates platelet integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem*, 277, 1919-23.
- VALERIUS, N. H. 1983. Chemotaxis, spreading and oxidative metabolism of neutrophils: influence of albumin in vitro. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C*, 91, 43-9.
- VALONE, F. H., AUSTEN, K. F. & GOETZL, E. J. 1974. Modulation of the random migration of human platelets. *J Clin Invest*, 54, 1100-6.
- VAN KOOTEN, T. G., SCHAKENRAAD, J. M., VAN DER MEI, H. C. & BUSSCHER, H. J. 1992. Influence of substratum wettability on the strength of adhesion of human fibroblasts. *Biomaterials*, 13, 897-904.

- VARGA-SZABO, D., BRAUN, A. & NIESWANDT, B. 2009. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost*, 7, 1057-66.
- VARGA-SZABO, D., PLEINES, I. & NIESWANDT, B. 2008. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 403-12.
- VASILIEV, J. M. 1991. Polarization of pseudopodial activities: cytoskeletal mechanisms. *J Cell Sci*, 98 (Pt 1), 1-4.
- VASILIEV, J. M., GELFAND, I. M., DOMNINA, L. V., IVANOVA, O. Y., KOMM, S. G. & OLSHEVSKAJA, L. V. 1970. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J Embryol Exp Morphol*, 24, 625-40.
- VERIN, A. D., BIRUKOVA, A., WANG, P., LIU, F., BECKER, P., BIRUKOV, K. & GARCIA, J. G. 2001. Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 281, L565-74.
- VOLGGER, M. 2008. Lichtmikroskopie- Theorie und Anwendung.
- WEGNER, A. 1976. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol*, 108, 139-50.
- WHITE, J. G. & RAO, G. H. 1998. Microtubule coils versus the surface membrane cytoskeleton in maintenance and restoration of platelet discoid shape. *Am J Pathol*, 152, 597-609.
- WILSON, C. A., TSUCHIDA, M. A., ALLEN, G. M., BARNHART, E. L., APPLGATE, K. T., YAM, P. T., JI, L., KEREN, K., DANUSER, G. & THERIOT, J. A. 2010. Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmilling through network disassembly. *Nature*, 465, 373-7.
- XU, H. T., YUAN, X. B., GUAN, C. B., DUAN, S., WU, C. P. & FENG, L. 2004. Calcium signaling in chemorepellant Slit2-dependent regulation of neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 4296-301.
- YAM, P. T., WILSON, C. A., JI, L., HEBERT, B., BARNHART, E. L., DYE, N. A., WISEMAN, P. W., DANUSER, G. & THERIOT, J. A. 2007. Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *J Cell Biol*, 178, 1207-21.

- YAMNIUK, A. P., NGUYEN, L. T., HOANG, T. T. & VOGEL, H. J. 2004. Metal ion binding properties and conformational states of calcium- and integrin-binding protein. *Biochemistry*, 43, 2558-68.
- YAMNIUK, A. P. & VOGEL, H. J. 2005. Calcium- and magnesium-dependent interactions between calcium- and integrin-binding protein and the integrin α IIb cytoplasmic domain. *Protein Sci*, 14, 1429-37.
- YANG, H., GANGULY, A. & CABRAL, F. 2010. Inhibition of cell migration and cell division correlates with distinct effects of microtubule inhibiting drugs. *J Biol Chem*, 285, 32242-50.
- YANG, S. & HUANG, X. Y. 2005. Ca^{2+} influx through L-type Ca^{2+} channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration. *J Biol Chem*, 280, 27130-7.
- YANO, Y., SAKON, M., KAMBAYASHI, J., KAWASAKI, T., SENDA, T., TANAKA, K., YAMADA, F. & SHIBATA, N. 1995. Cytoskeletal reorganization of human platelets induced by the protein phosphatase 1/2 A inhibitors okadaic acid and calyculin A. *Biochem J*, 307 (Pt 2), 439-49.
- YUMURA, S., FURUYA, K. & TAKEUCHI, I. 1996. Intracellular free calcium responses during chemotaxis of Dictyostelium cells. *J Cell Sci*, 109 (Pt 11), 2673-8.
- ZILG, H., SCHNEIDER, H. & SEILER, F. R. 1980. Molecular aspects of albumin functions: indications for its use in plasma substitution. *Dev Biol Stand*, 48, 31-42.